

Sundt korn i et ændret miljø

Mange forskellige faktorer har indflydelse på, hvor hårdt kornplanter angribes af svampearter fra slægten *Fusarium*. Vi har undersøgt effekten af at dyrke byg ved lavt kvælstofniveau. Detaljerede analyser af den samlede proteinmængde i bygkerner viser, at *Fusarium*-angreb kan føre til ændringer i kornets egne proteiner. Vi har også identificeret hidtil ukendte svampeproteiner, som kan have betydning for udvikling af sygdom i planten.

Af Christine Finnie^a, Fen Yang^a, Jens Due Jensen^b, Niels Henrik Spliid^c, Birte Svensson^a, Susanne Jacobsen^a, Lise Nistrup Jørgensen^c, Hans J.L. Jørgensen^b og David B. Collinge^b

^aInstitut for Systembiologi, Danmarks Tekniske Universitet. ^bInstitut for Plantebiologi og Bioteknologi, LIFE, Københavns Universitet. ^cInstitut for Plantebeskyttelse og Skadedyr, DJF, Aarhus Universitet.

Ydre miljøfaktorer som vejrforhold, jordens indhold af næringsstoffer og luftens sammensætning, påvirker ikke kun planters vækst og udvikling. De påvirker også de svampe, som angriber planterne. Patogene svampearter fra slægten *Fusarium* udgør et stigende problem i kornproduktionen verden over. I Danmark kan en del af stigningen tilskrives øget smittetryk som følge af ændret afgrødevalg, f.eks. dyrkning af majs frem for foderroer, men andre faktorer kan også spille ind. Med en stigende temperatur kan vi formentlig forvente en ændret forekomst af de forskellige arter af *Fusarium*, som kan angribe kornarterne. Inden for de sidste 10 år ser der således ud til at være en stigning i mængden af *Fusarium graminearum*, som generelt regnes for mere varmekrævende. Tidligere var det *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum* og *Microdochium nivale* (tidligere kendt under navnet *Fusarium nivale*), som dominerede i Danmark. Hvorvidt ændringen primært skyldes ændret vejr eller ændret afgrødesammensætning vides ikke med sikkerhed.

Fusarium kan angribe alle kornarterne. Hos byg og hvede er symptomerne som oftest tydelige (Figur 1 og 2), mens det kan være svært at se symptomer på inficeret havre. Hos alle kornarterne kan *Fusarium*-angreb føre til udbyttetab, og desuden dannes svampetoksiner i kornet.

Fusarium-toksinerne deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV) og zearalenon (ZEA) er meget skadelige for såvel dyr som mennesker. I 2006 blev der fastsat grænseværdier

for det maximale indhold af *Fusarium*-toksiner i korn i EU. Det er en stor udfordring for landmændene at overholde grænseværdierne, da det i visse vækstsæsoner og sædskifter er svært at undgå *Fusarium*-angreb i marken. Svampens vækst kan hæmmes, hvis kornmarken behandles med svampemidler (fungicider), men effekten af svampemidlerne er ofte forholdsvis begrænset (50-60 %) og vil ikke kunne reducere toksin-niveauet i kernerne



Figur 1. *Fusarium*-inficerede aks fra byg. Symptomerne ses som tidlig visning af småaks, og under fugtige forhold ses orange til lyserød svampevækst på aksene.



Figur 2. Kerner fra *Fusarium*-inficeret byg. *Fusarium*-inficerede kerner (til venstre) bliver indskrumpede og misfarvede.

i tilstrækkelig grad. I nogle tilfælde kan sprøjtning med fungicider endda øge toksindannelsen. Det anbefales derfor ikke, at landmændene vælger denne strategi. I stedet anbefales de at begrænse *Fusarium*-angrebet ved at vælge de mindst modtagelige sorter og ved at begrænse mængden af smitstof i marken. Det gøres f.eks. ved at lade afgrøder, som ikke er vært for *Fusarium*, indgå i sædskiftet.

Reduceret forbrug af kvælstofgødning

Siden Vandmiljøplan I og II blev implementeret, er der sket en betydelig reduktion i danske landmænds forbrug af kvælstofgødning, og der ventes yderligere stramninger af lovgivningen, som har til formål at reducere udledningen af næringsstoffer til vandmiljøet. Mens nogle undersøgelser har vist, at *Fusarium*-angreb og toksindannelsen i kornmarker bliver reduceret, når den mængde kvælstof, som er tilgængelig for afgrøden reduceres, har andre undersøgelser vist det modsatte.

Et problem med markforsøg er, at selvom forholdene ligner landbrugets naturlige betingelser, er der mange faktorer, der kan påvirke forsøgsresultaterne. Det kan f.eks. være vejforhold og angreb af andre patogener, der er svære at kontrollere. Derfor kan det være vanskeligt at finde forklaringen på tilsyneladende modsigende resultater.

For at få et mere nøjagtigt billede af, hvordan kvælstof kan påvirke *Fusarium*-angreb under mere kontrollerede forhold, har vi dyrket bygplanter ved forskellige niveauer af kvælstof i udendørs forsøg i pletter og har sammenlignet angrebsgrad, toksinindhold og proteinsammensætning i kernerne. Vi har brugt biokemiske analysemetoder til at bestemme mængde og sammensætning af toksiner (Boks 1), molekylærbiologiske metoder til at bestemme angrebsgrad og artssammensætning for svampen (Boks 2) og proteomanalyser til at undersøge effekten af *Fusarium*-angreb i kerner fra byg (Boks 3). Tilsammen belyser disse analyser samspillet mellem svamp og plante. Vi har nu fået et mere nuanceret billede af, hvordan kornets indholdsstoffer ændres, når planterne er angrebet af *Fusarium*. I pletterforsøgene fandt vi øgede *Fusarium*-angreb ved lavt kvælstofniveau, mens der ikke er entydig korrelation under markforhold.

Dyrkning og behandling af forsøgsplanter

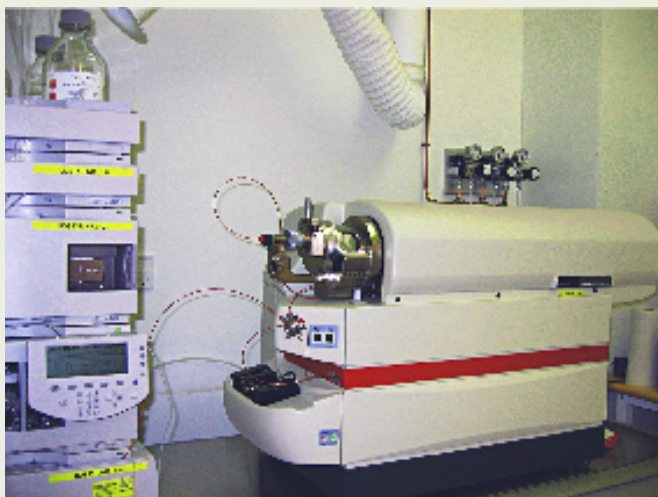
Fusarium angriber alle kornarter, men vi har fokuseret på samspillet mellem *Fusarium* og byg. I de forsøg, som beskrives her, undersøgte vi effekten af en specifik stamme (R-77550) af *Fusarium graminearum* på den modtagelige bygsort "Scarlett". Forsøgsplanterne blev dyrket i pletter i væksthus med enten lavt eller højt niveau af kvælstofgødning. Kvælstofniveauerne svarede til 15 og 100 kg N/ha. Halvdelen af planterne blev påført *Fusarium*-sporer, og efter høst blev modne kerner fra alle fire behandlinger formålet og brugt til de forskellige analyser som beskrevet nedenfor.

Måling af svampetoxin

Mængden af de tre *Fusarium*-toksiner, DON, NIV og ZEA, blev bestemt ved væskechromatografi og massespektrometri (LC-MS/MS, Boks 1). Disse analyser viste, at bygplanter, som var dyrket ved lavt kvælstofniveau havde et højere

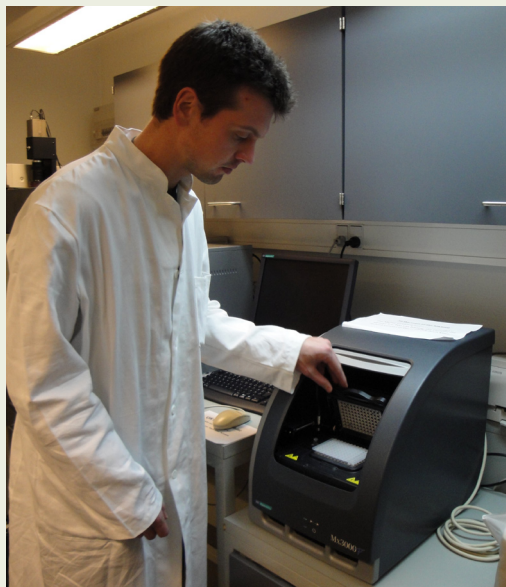
Boks 1. Analyse for svampetoksiner ved Institut for Plantebeskyttelse og Skadedyr, Aarhus Universitet

Toksinindhold og sammensætning bestemmes ved væskechromatografi koblet til dobbelt massespektrometri (LC-MS/MS). Væskechromatografi (Liquid chromatography, LC) er en metode til adskillelse af molekyler i en blanding. Blandingen påsættes toppen af en søjle, der indeholder et gelmateriale. Når der tilsættes væske, bevæger molekylerne sig igennem søjlen. Molekylerne adskilles, fordi nogle af dem bliver mere forsinkede end andre af gelmaterialet. LC-apparatet til venstre adskiller de enkelte toksiner, mens de dobbelte massespektrometer (MS/MS) til højre måler molekylernes masse og koncentration. *Fusarium*-toksinerne DON, NIV og ZEA har biologisk effekt selv ved meget lav koncentration og EUs grænseværdier er sat så tæt på detektionsgrænsen, som det er teknisk muligt. Det er dyrt og tidskrævende at foretage præcise målinger af koncentrationen, og det kan være en af grundene til, at der først er fastsat grænseværdier i 2006.



Boks 2. Analyse af DNA ved Institut for Plantebiologi og Bioteknologi, Københavns Universitet

I de senere år er metoderne til at bestemme DNA-sekvensen for en organismes samlede arvemasse (genom) blevet automatiseret og væsentlig billigere end for blot få år siden. Sekventering af hele genomet for en organisme er dog stadig et stort og meget dyrt projekt, som kun kan gennemføres af store internationale forskningskonsortier. Genomet for nogle af de vigtigste arter af bakterier, svampe, planter og dyr er blevet sekventeret, og disse data findes i offentligt tilgængelige databaser. *Fusarium graminearum* er en af de sygdomsfremkaldende svampearter, som er blevet sekventeret, og hele DNA sekvensen, som er på 36,1 megabasepar fordelt på 4 kromosomer og cirka 13.000 gener, blev offentliggjort i 2007.



Polymerase Kædereaktion (PCR)

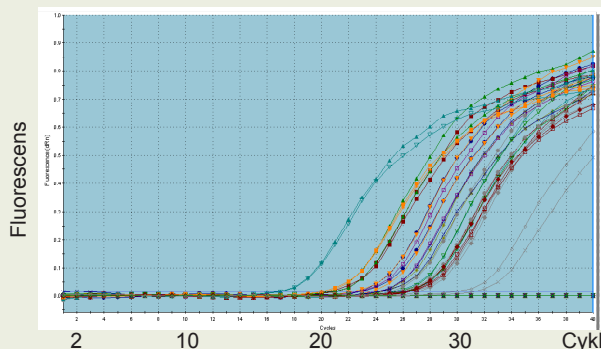
Polymerase Chain Reaction (PCR) er en metode til at lave mange kopier af udvalgte DNA-sekvenser. Med kendskab til svampens DNA-sekvens, kan man designe et sæt primere, der matcher et bestemt stykke af svampens genom. Vi har anvendt en serie primersæt, som passer til de forskellige arter af *Fusarium*, og vi kan nu bruge PCR til at bestemme, hvilke arter af *Fusarium*, der har inficeret plantematerialet.

Real-Time Kvantitativ PCR

Ved hjælp af en kvantitativ PCR-metode, Real-Time quantitative PCR (qPCR), kan man bestemme mængden af DNA fra svampene i prøverne og dermed få et indirekte udtryk for svampens biomasse. I nogle tilfælde kan også indholdet af svampe-toksin estimeres ud fra mængden af DNA, men ofte er korrelationen meget usikker. Ved qPCR inkorporeres et fluorescerende stof i de DNA-molekyler, som dannes. Mens qPCR-maskinen kører, måles stigningen i fluorescens fra hver af de 96 prøver for hver PCR-cyklus. Som regel kører maskinen 40 amplifikations-cykler. I teorien fordobles antallet af DNA-molekyler for hver PCR-cyklus, men i praksis er væksten kun eksponentiel i en del af PCR-forløbet (se diagram herunder).

Analyse af qPCR-data

Når Real-Time PCR-maskinen er færdig, vises data som kurver i et diagram (amplifikations-plot) med antal cykler ud ad X-aksen og den målte fluorescens op ad Y-aksen. Heraf kan man se, hvor mange PCR cykler, der skal til, for at fluorescensen overstiger et vist niveau (basislinie). Basislinien overskrides først for de prøver, hvor der har været mest DNA i udgangsmaterialet. Mængden af svampe-DNA i prøverne kan beregnes vha. en standardkurve.



Analyser af planters DNA og RNA

I dette projekt fokuserer vi på patogenets DNA, men i andre projekter drager vi stor nytte af de offentliggjorte DNA-sekvenser for planter. Planter indeholder langt mere DNA end mikroorganismer, men der er meget stor forskel på plantegenomernes størrelse. Nogle af de vigtigste afgrødearter har meget store genomer, og derfor er kun brudstykker af deres genom sekventeret. Genomet for byg er omkring 5000 megabasepar (5×10^9 bp) fordelt på 7 kromosomer i en haploid celle, og det er endnu ikke sekventeret. Ris er nært beslægtet med byg, men har et genom, der er 12 gange mindre. Hele DNA-sekvensen for ris blev offentligt tilgængelig i 2005, og disse data er til stor hjælp for forskere, som arbejder med byg. Når der er identificeret gener, som har bestemte funktioner i ris, kan man forholdsvis let finde tilsvarende gener i byg.

Sammenligninger af DNA fra forskellige genotyper indenfor en planteart er meget værdifulde, når man skal kortlægge genernes placering på kromosomerne eller bestemme hvilken fænotype, der svarer til forskellige alleler af et gen, men når forskellige væv eller udviklingstrin i en plante undersøges, sammenligner man i stedet mRNA. Alle celler i en plante indeholder det samme genom, og når f.eks. blade, rødder og kerner er forskellige skyldes det, at det er forskellige sæt af gener, der kommer til udtryk i bestemte væv og på bestemte tidspunkter under plantens udvikling. Desuden ændres aktiviteten af nogle af plantens gener som svar på ændringer i plantens omgivelser, f.eks. temperatur, tørke, og tilstedeværelse af patogener. Et gen indeholder opskriften på et protein og information om, hvor og hvornår proteinet skal produceres i planten, men der er stor forskel på proteiners stabilitet, og efter syntesen kan et protein desuden modificeres, så det får en anden biologisk funktion. Analyser af DNA og RNA kan fortælle meget om planters dyrkningsmæssige potentiale og genernes aktivitet, men for at måle effekten af miljøpåvirkninger i detaljer, må man studere proteinerne.

toksindhold i kernerne, end planter, som var dyrket ved højt kvælstofniveau. Forholdet mellem mængden af svampe-DNA i en prøve og koncentrationen af toksin var dog det samme ved lavt og højt kvælstofniveau. Det tyder på, at svampens evne til at danne toksin er upåvirket eller meget lidt påvirket af kvælstofniveauet. Den øgede koncentration af toksin i kerner fra byg, som er dyrket ved lavt kvælstofniveau, skyldes således primært, at svampen stimuleres til at vokse mere i de kvælstof-fattige bygplanter, så der er mere svampemycelium, der kan danne toksiner.

Kvantificering af svampeangreb

Efter høst af forsøgsplanterne blev andelen af *Fusarium*-beskadigede kerner bestemt. Derefter målte vi mængden af svampe-DNA i prøverne ved hjælp af en kvantitativ PCR-metode (Boks 2). Det viste sig, at bygkernerne i højere grad var angrebet af *Fusarium*, når planterne blev dyrket ved lav kvælstoftilførsel. Også en større andel af kernerne viste tegn på *Fusarium*-angreb, og prøverne indeholdt mere svampe-DNA end prøver fra planter, der havde været dyrket ved højt kvælstofniveau.

Analyse af proteomer

For at finde frem til proteiner, der har betydning for samspillet mellem svamp og plante, og for at klarlægge, hvordan kvælstof påvirker *Fusarium*-angreb af bygkerner, sammenlignede vi det samlede sæt af proteiner (proteomet) for hhv. *Fusarium*-inficerede kerner og kontrolkerner. Proteinerne blev ekstraheret og derefter adskilt vha. todimensional gelelektroforese (2-DE, figur 3 og boks 3a). For at sammenligne gelerne brugte vi billedanalyse og en statistisk beregningsmetode, som kaldes Principal Component Analysis (PCA). Udvalgte proteinpletter på gelerne blev oprenset og analyseret ved hjælp af massepektrometri (Boks 3b).

Ændret proteinmønster

Billedanalyse og PCA af farvede 2-DE geler viste, at der var ændringer i mængden af protein i 188 af de mange hundrede protein-pletter på gelerne, når man sammenlignede geler for *Fusarium*-inficerede bygkerner og kontrolprøver. Ved hjælp af massespektrometri kunne langt de fleste af proteinerne i disse pletter identificeres. I ni tilfælde var der tale om proteiner fra *Fusarium*-svampen. Der var meget lidt svampe-biomasse i prøverne i forhold til plantemateriale, og de ni proteiner må derfor have været til stede i høje mængder i svampen. Det tyder på, at disse ni svampeproteiner har en meget vigtig biologisk funktion.

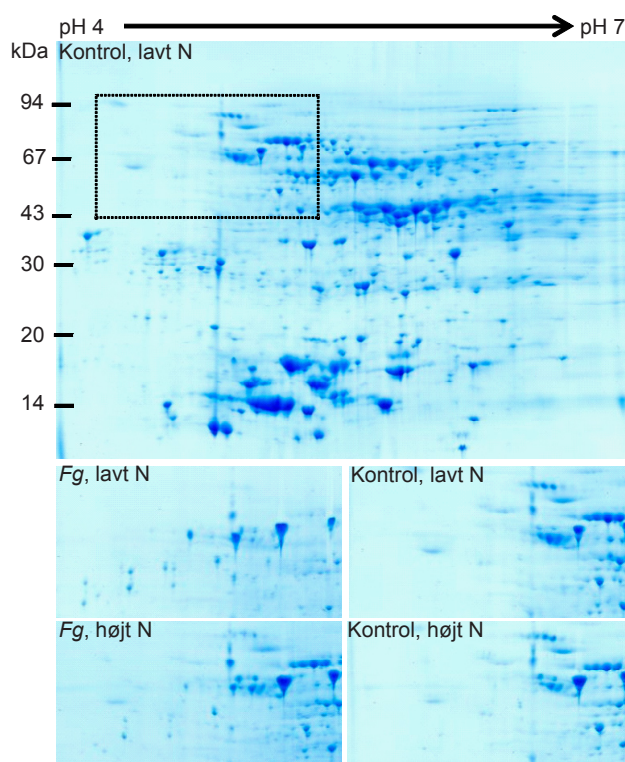
Antioxidanter

To af de svampeproteiner, som vi identificerede, var superoxiddismutaser. Det er enzymer, der fungerer som antioxidant, idet de nedbryder reaktive iltforbindelser. Planter bruger ofte reaktive iltforbindelser som en del af deres forsvar mod patogenangreb. Vores resultater tyder

på, at *Fusarium*, der angriber en plante, beskytter sig mod plantens modangreb ved at lave antioxidant som superoxiddismutaser, der fjerner de reaktive iltforbindelser.

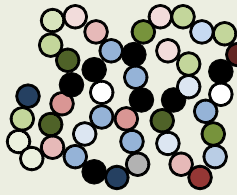
Nedbrudte proteiner

De fleste af de proteiner, som vi identificerede, stammede fra byg. Da små proteiner kører hurtigere gennem andendimensions gelen end større proteiner, kan et proteins masse beregnes ud fra plettens koordinater på 2-DE gelen. Det er bemærkelsesværdigt, at de fleste bygproteiner i pletter, der forekom med højere intensitet i *Fusarium*-inficerede prøver, i 2-DE viste lavere masse end forventet, ud fra de kendte proteinsekvenser i databasen. Det viste sig, at disse pletter indeholdt nedbrudte proteiner, og at de intakte udgaver af de samme proteiner havde en anden position på gelen. Det ser altså ud til, at mange planteproteiner bliver nedbrudt under *Fusarium*-angreb, og det kan have stor betydning for kornets kvalitet. I overensstemmelse med de øvrige analyser, kunne vi se at *Fusarium*-angreb førte til større ændringer i proteomet fra bygkerner fra planter, som blev dyrket med lavt kvælstofniveau, end fra kerner fra planter, som blev dyrket ved højt kvælstofniveau (Figur 3).



Figur 3. To dimensionel gel-elektroforese af proteiner fra bygkerner. 2D-gelen for kontrolprøven (øverst) viser flere hundrede farvede proteinpletter. Det markerede område vises nedenunder for de fire forsøgsbetingelser. Bygplanter blev dyrket med lavt eller højt kvælstof (N), med *Fusarium graminearum* (Fg) eller uden (Kontrol). Der kan ses flere tydelige forskelle, især mellem Fg og kontrolgeler. De fleste proteiner i de varierende pletter er identificeret vha massespektrometri.

Boks 3a. Proteomanalyse af bygkerner ved Institut for Systembiologi, Danmarks Tekniske Universitet



Proteiners struktur og funktion

Et protein består af en kæde af aminosyrer i en bestemt rækkefølge (sekvens). Med enkelte undtagelser består levende organismers proteiner af 20 forskellige aminosyrer, der kan sættes sammen i utallige kombinationer. Derfor varierer proteiner i størrelse, kemiske egenskaber, struktur og funktion. Nogle proteinmolekyler er enzymer, der fungerer som katalysatorer i cellens kemiske omsætning. Andre er strukturelle proteiner, f.eks. proteiner, der stabiliserer membraner.

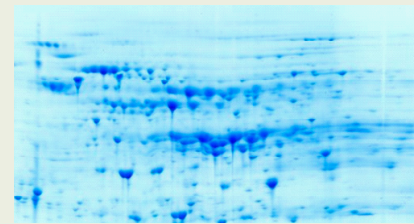
Proteomet

Det samlede sæt proteiner, der fremstilles ud fra et genom, betegnes et proteom. Efter syntesen kan et protein undergå et stort antal kemiske modifikationer af strukturen og hermed ændre funktionen. Proteomet er således meget mere dynamisk og kompliceret end genomet. En analyse af hvilke proteiner, der findes på et givent tidspunkt i en bestemt del af planten, kan derfor fortælle meget om plantens tilstand. En proteomanalyse omfatter resultaterne af flere forskellige analysemetoder og giver et nuanceret billede af proteinsammensætningen i en biologisk prøve.



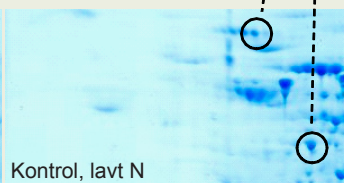
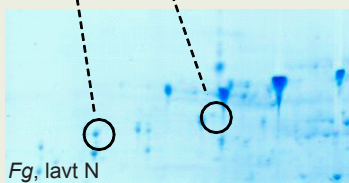
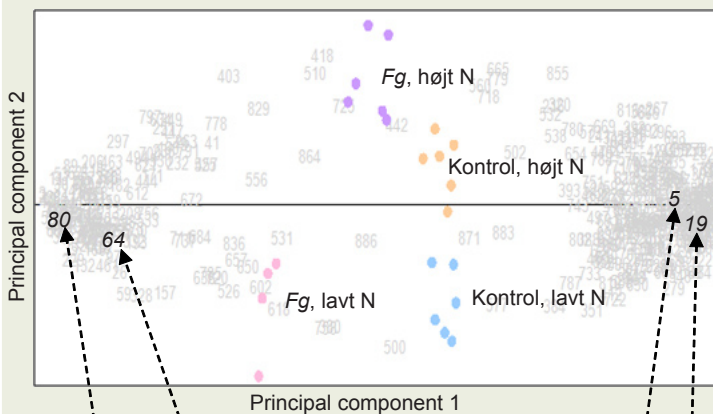
Gel-elektroforese i to dimensioner

Proteomet fra en plante indeholder mange tusinde proteiner i komplekse blandinger, og første trin i analysen er at adskille dem i fraktioner efter størrelse og ladning. Det gøres f.eks. ved to-dimensionel gel-elektroforese (2-DE). Ved 2-DE sættes prøverne på en gel, hvor proteiner vandrer i et elektrisk felt. Først vandrer proteinerne i forhold til deres ladning. I et nyt elektrisk felt vinkelret på det første, adskilles proteinerne i forhold til deres størrelse. Bagefter farves gelen, og proteinerne kan ses som pletter på gelen.



Digital billedbehandling og statistisk analyse

Selv under meget kontrollerede betingelser vil der være små afvigelser fra den ene 2D-gel-elektroforese-kørsel til den næste. Disse afvigelser kan korrigeres ved hjælp af digital billedbehandling af 2D-gelerne.



Efter billedbehandling af de farvede proteinpletter i 2D-geler kan der anvendes forskellige former for databehandling til at kortlægge forbindelse mellem proteinpletterne i 2D-gelen (billedet af proteomet) og biologiske egenskaber. Oftest anvendes en multivariat dataanalysemetode, som for eksempel Principal Component Analysis (PCA). Efter en PCA analyse kan man se en sammenklumpning af gelpletter (vist som tal i billedet til venstre), som afspejler variationen mellem gelbillederne. Det er bl.a. vist ved hjælp af PCA, at det er muligt at gruppere 2D-geler (vist som farvede pletter) i distinkte grupper afhængigt af deres proteinmønstre.

Ved at sammenligne protein-pletmønstre på geler for kerner, hvor planterne er behandlet forskelligt, kan man finde frem til de gel-pletter, der indeholder proteiner, som er knyttet til prøvernes biologiske egenskaber. I dette tilfælde identificeres gel-pletter, der ændres som følge af *Fusarium*-angreb. Når man har fundet disse gelpletter, skal de enkelte proteiner i gelpletterne identificeres og karakteriseres. Det gøres typisk ved brug af massespektrometri.

Boks 3b. Proteomanalyse af bygkerner ved Institut for Systembiologi, Danmarks Tekniske Universitet

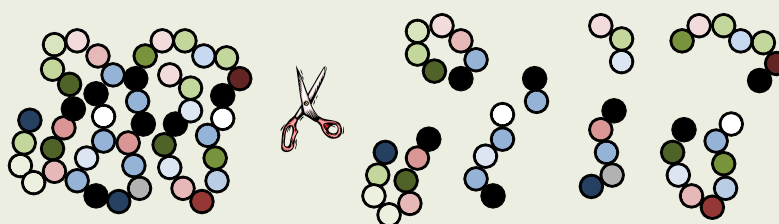
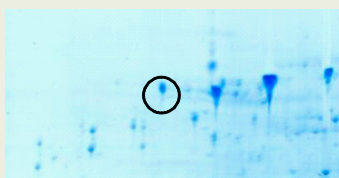


Oprensning af proteiner i en plet

Efter 2-DE skæres de interessante proteinpletter ud af gelen. Da der arbejdes med meget små proteinmængder, er det vigtigt at undgå forurening af prøverne. Den mest almindelige kilde til forurening er støv, som hovedsageligt består af hudceller. Støvet indeholder proteinet keratin, der findes både i hud og hår. Det er derfor meget vigtigt, at laboratoriet holdes støvfrit, og når gellerne håndteres, tager vi også handsker og hårnæt på.

Proteinerne klippes i mindre dele

De oprensede proteiner fra en plet behandles med enzymet trypsin, der klipper proteinerne i mindre dele (peptider). I det viste eksempel klippes proteinet efter aminosyrerne lysin og arginin (markeret med sort). Derefter bruges massespektrometri til at bestemme peptidernes masser, som afhænger af peptidernes længde og aminosyresammensætning.

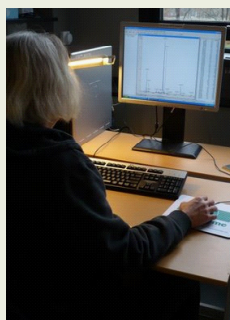
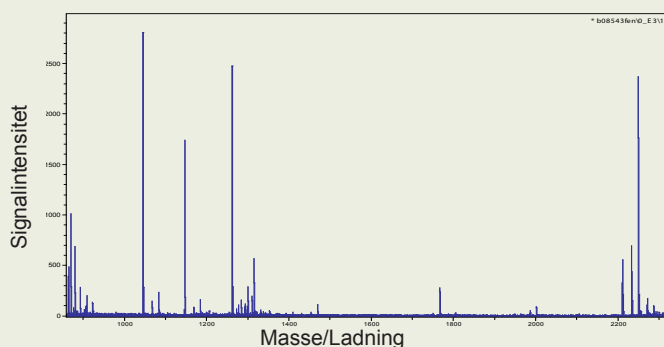


Vejning af molekyler

Massespektrometri er en metode til at veje molekyler, heriblandt proteiner og peptider. Denne analysemetode er meget præcis og ekstremt følsom, og det er muligt at analysere uhyre små proteinmængder. Massespektrometri kan bruges til at identificere, hvilke(t) protein(er), der var til stede i en gelplet, via de karakteristiske peptidmasse "fingerprint", som ses på det diagram, som der angiver resultatet, når en prøve analyseres. De peptider, som dannes, når et protein klippes i mindre dele, ses som toppe i diagrammet.

Hvad sker der inde i et massespektrometer?

Billedet viser Ultraflex II MALDI-TOF-TOF massespektrometret. Peptidblandinger fra en proteinprøve påsættes en plade, som indføres i massespektrometret. Ved at skyde på prøverne med en laser, får man peptiderne i gasfase. Et elektrisk felt får peptiderne til at flyve i et vaccum igennem et ca. 3 m langt rør, indtil de rammer en detektor. De små peptider flyver hurtigere og rammer detektoren før de store. Ved at måle peptidernes flyvetid, kan man beregne deres masse.



Sammenligning med proteiner i en database

De målte peptidmasser sammenholdes med en database, for derved at finde en kendt proteinsekvens med samme "fingerprint". Massespektrometri kan også bruges til at bestemme rækkefølgen af aminosyrer i et peptid eller protein, samt til at opklare et proteins kemiske modifikationer, der kan have betydning for dets funktion.

847.4735
958.4569
1179.5375
1319.6409
1458.6973
1607.8008
1938.9930
2036.9436
2191.1330
2251.0627
2403.2098
2754.3835

578.4650
759.4258
823.5573
1435.6503
1475.6994
1702.7632
1891.9032
1947.9970
1993.9588
2036.9506
2211.0996
2249.0684
2705.1716
2807.3473
3340.7427

Forskel på sorter af byg

Det er ikke lykkedes endnu at forædle bygsorter, der er fuldt resistente overfor *Fusarium*-angreb, men nogle bygsorter har reduceret modtagelighed for svampen. Måske skyldes det, at nogle sorter kan være lidt bedre til at aktivere forsvarsmekanismer (f.eks. dannelse af reaktive ilforbindelser), når svampen angriber, eller at nogle har en sammensætning af næringsstoffer i kernen, der tillader en højere svampevækst. Det vil vi undersøge, ved at kortlægge ændringer i proteomer i kerner kort tid efter *Fusarium*-angreb for en række udvalgte bygsorter. Ved at finde frem til proteiner, hvis mængde korrelerer med lavere modtagelighed for *Fusarium*, kan vi bane vejen for, at man gennem forædling, kan fremme en proteinsammensætning i bygkerner, der begrænser *Fusarium*-infektionen og toksinsyntesen.

Konklusioner

Bygplanter, som blev dyrket i væksthush ved lavt kvælstof-niveau, viste flere sygdomstegn efter *Fusarium*-angreb, end planter som fik mere kvælstof. Også toksinindholdet i kernerne var højere ved dyrkning ved lavt kvælstof-niveau. Ved hjælp af proteomanalyse identificerede vi proteiner fra både fra svamp og værtsplante, som formodes at spille en rolle for udvikling af sygdommen. Både mængden og graden af nedbrydning af disse proteiner afhænger af *Fusarium*-angreb og påvirkes af kvælstofniveauet.

At vi ser en anden effekt af kvælstof i væksthush end i nogle af de publicerede markundersøgelser, viser at der stadigvæk er ukendte faktorer, der påvirker kornsorters modtagelighed for *Fusarium*. Vi vil derfor undersøge både toksinindholdet og proteomet i *Fusarium*-angrebne kerner fra markforsøg, hvor planterne er dyrket med lavt eller højt kvælstof-niveau, hvor kernerne tilsyneladende angribes i højere grad ved højt kvælstof-niveau.

De beskrevne forsøg indgår i et større dansk forskningsprojekt, som skal give det videnskabelige grundlag for at udvikle kornsorter med øget resistens. Målet er at give kornforædlerne redskaber til at udvikle sorter, som forsvare sig mod svampene, før angrebet gør skade, eller sorter, som begrænser svampenes evne til at danne toksiner. Traditionelt vurderes planters resistens ud fra symptomudvikling efter infektion, og der forædles videre

på de planter, som har færrest symptomer. Hvis det kan påvises, at kernernes proteom har betydning for svampenes evne til at danne toksiner, kan man fravælge planter med de proteom-typer, der korrelerer med toksindannelse ved svampeangreb. Ligeledes kan der være en sammenhæng mellem plantens proteom og svampens vækstpotentiale. For at undersøge om der findes sådanne sammenhænge, skal vi kortlægge proteomet fra bygsorter med forskellig modtagelighed for *Fusarium*.

Et andet mål er at skabe et solidt grundlag for vurdering af risikoen for *Fusarium*-angreb i byg både nu og fremover. Det forventes, at klimaændringer vil medføre stigende temperaturer og ændrede nedbørsforhold samtidig med at koncentrationen af både ozon og CO₂ i troposfæren er stigende. Flere forsøg i både væksthush og mark skal vise, om det er muligt at minimere angreb af *Fusarium* i korn under både nuværende og fremtidige dyrkningsbetingelser og dermed forbedre kornkvaliteten, så der kan produceres sundt foder og sunde fødevarer.

Referencer og videre læsning

- Cuomo A, et al. (2007) The *Fusarium graminearum* Genome Reveals a Link Between Localized Polymorphism and Pathogen Specialization. *Science* 317: 1400-1402.
- Finnie C, Søndergaard I, Jacobsen S (2005) Proteomanalyse. Kapitel 14 i *Proteiner - oprensning og karakterisering* (3. udgave) Kielberg V og Rasmussen L (Redaktører) Gyldendals Forlag, København.
- Hjernø K, Højrup P (2005) Massespektrometri. Kapitel 12 i *Proteiner - oprensning og karakterisering* (3. udgave) Kielberg V og Rasmussen L (Redaktører) Gyldendals Forlag, København.
- Jørgensen LN, Thrane U, Collinge DB, Jørgensen HJL, Jensen JD, Spliid NH, Nielsen GC, Rasmussen PH, Nicolaisen M, Justesen AF, Giese H, Bach IC (2008) *Fusarium* på korn skader planter, husdyr og mennesker. Planteforskning.dk
- Shetty NP, Jørgensen HJL, Jensen JD, Collinge DB, Shetty HS (2008). Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology*. 121: 267-280.
- Trail F (2009) For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiology* 149: 103-110
- Yang F, Jensen JD, Spliid NH, Svensson B, Jacobsen S, Jørgensen LN, Jørgensen HJL, Collinge DB, Finnie C. Investigation of the effect of nitrogen on severity of *Fusarium* head blight in barley. *J Proteomics* (in press) doi:10.1016/j.jprot.2009.10.010

Relateret forskningsprojekt

Denne artikel bygger på resultater fra et større dansk forskningsprojekt med titlen "*Fusarium* disease resistance - toxins and feed quality". Projektet støttes af Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri | FødevarerErhverv og konsortiet Plant Biotech Danmark. Det blev påbegyndt i 2007 og løber frem til 2011, og det udføres af forskere fra Danmarks Tekniske Universitet, Københavns Universitet og Århus Universitet. Professor David B. Collinge fra Institut for Plantebiologi og Bioteknologi, Københavns Universitet er projektleder.