

Ulf Axelsson
Hushållningssällskapet Skaraborg

Anders Jonsson
SLU, Skara

Jämförelse mellan okulär gradering och PCR-teknik för att bestämma angrepp av växtpatogener i höstvet.

Sammanfattning

I dagsläget görs graderingar av växtpatogener i sort och växtskyddsförsök genom okulär gradering. Systemet med okulär gradering har ett antal svagheter. Metoden är tidskrävande, den kräver tillgång till kvalificerad personal och därtill kommer att olika personer graderar olika. Det finns också en risk att förväxla symptom på växtnärbriist med svampangrepp och att graderare helt missar förekomsten av patogener vid blandinfektioner. Det senare noterades också i denna undersökning.

I tidigare undersökningar har blad plockats och sedan delats upp i två grupper som antingen graderats okulärt eller analyserats med polymeras chain reaction, PCR- teknik. Till skillnad mot tidigare projekt, där en omgång prov graderades okulärt och en omgång prov analyserades med PCR-teknik, gjordes i denna undersökning den okulära graderingen och bestämningen med PCR-teknik på samma blad.

Resultaten visar en mycket god samstämmighet mellan kvantitativ PCR- bestämning och okulär gradering av svampsjukdomar i höstveteförsök. Den okulära graderingen missade förekomsten av både vetets bladfläcksjuka, *Drechslera tritici-repentis*, och brunfläcksjuka, *Spagnospora nodorum*. Svartpricksjuka, *Septoria tritici*, var den helt dominerande patogenen och den svamp vars angrepp skattades i den okulära graderingen. Korrelationen för *S. tritici* var $R^2=0,98$.

Resultaten är jämförbara med tidigare observerade samband mellan PCR-bestämning och okulär gradering av *S. tritici*. Jämfört med tidigare undersökning där graderingen gjordes på olika bladmaterial visar denna undersökning att det går att använda bägge arbetsmetoderna. Resultaten visar också att PCR-tekniken kan upptäcka och diagnostisera dessa patogener redan vid små angrepp (<1% angripen yta). Sammanfattningsvis kan PCR-tekniken ge en effektiv och säker gradering av växtpatogener i höstvet. Metoden kan bidra till ett effektivare och bättre utnyttjande av fältförsök, för bedömning av effekter av växtskyddsmedel på specifika bladpatogener och för bedömning av växtens tolerans mot specifika patogener.

Bakgrund och syfte

I den Svenska officiella sortprovningen ingår idag en gradering av växtpatogener. Graderingen sker genom okulär besiktning med hjälp av den s.k. "danska modellen". (Försökshandboken, 2012). Metoden innebär att gradering sker i fält genom okulär jämförelse direkt i beståndet. Metoden är osäker och kräver stor erfarenhet, god växtpatologisk kompetens samt att samma person helst gör bedömningen för att ge repeterbarhet och precision. En ytterligare osäkerhetsfaktor är risken för förväxling, dels av olika svampsjukdomar, men även andra symptom, som växtnärbriister och fysiologiska fläckar. Eftersom sortprovningen är spridd över hela Sverige innebär det att flera personer är inblandade i graderingsarbetet.

Sorterna sjukdomsmottaglighet är en mycket avgörande faktor för sortens lämplighet att godkännas för odling. Det kommer med de nya direktiven om ”Hållbar användning av bekämpningsmedel” att bli än mer viktigt och till och med krav på att de mest sjukdomsresistenta sorterna odlas. (Europaparlamentets och Rådets direktiv 2009/128/EG 71:86. 2009)

Gradering av svampar med okulära metoder har alltså flera svagheter: osäker diagnos, särskilt när flera sjukdomar förekommer samtidigt och risk för förväxling med symptom orsakade av växtnäringsbrister och/eller fysiologiska fläckar. Detta gör att såväl lantbrukare som rådgivare ibland undviker att fastställa sjukdomar i ett fält pga. att det upplevs som alltför osäkert. Många fältförsök blir därför inte heller optimalt utnyttjade och utvärderade, eftersom en metod med hög tillförlitlighet och reproducerbarhet saknas. Detta gäller både fungicid- och sortförsök, såväl som andra försök med exempelvis olika jordbearbetningssystem, växtföljder mm.

I SLF projektet ”Gradering av patogenangrepp i vete med kvantitativ PCR-metodik” har s.k. kvantitativa PCR-metoder utvecklats i samarbetet mellan Charlott Almquist och Anders Jonsson vid AnalyCen AB (numera Eurofins Food and Agro AB) och Scanbi Diagnostic AB för att bestämma tre svampsjukdomar i höstvet; svartpricksjuka (*S. tritici*), vetets bladfläcksjuka (*D. tritici-repentis*) och brunfläcksjuka (*S. nodorum*). I PCR-metoden utnyttjas termostabila enzymer och artspecifika DNA-prober, för att selektivt detektera och mångfaldiga en specifik DNA sekvens genom ett antal processteg. När mängden DNA når en viss kvantitet kan den detekteras i ett PCR- instrument och innehållet av den sökta patogenen i ett prov kan beräknas. Resultatet i det tidigare projektet visar på en god korrelation mellan prover uttagna för bestämning med PCR-teknik och prover graderade okulärt (Almqvist et al. 2008).

Liknande undersökningar har gjorts internationellt och visar ett relativt gott samband mellan PCR-teknik och okulära symptom för *S. tritici* från fält och modellstudier (Fraaije et al. 1999, Fraaije et al. 2001, Fraaije et al. 2002, Guo et al. 2006, Guo et al. 2007, Rohel et al. 2002). I den tidigare beskrivna undersökningen ”Gradering av patogenangrepp i vete med kvantitativ PCR-metodik” har blad plockats och sedan delats upp i två grupper som antingen graderats okulärt eller analyserats med PCR-teknik. Till skillnad mot tidigare projektet sker i denna undersökning den okulära graderingen och bestämningen med PCR-tekniken nu på samma blad för att jämföra urvalsmetoderna.

I förlängningen är syftet att kunna använda PCR-tekniken för att göra sjukdomsgraderingar i sort och fungicidförsöken samt även för att ställa diagnos i praktisk odling.

Material och metoder

Under sommaren 2010 har bladprover från de s.k. A-rutegraderingarna i växtskyddsförsök i höstvet samlats in på Växtskyddscentralen i Skara. De så kallade A-rutegraderingarna var de obehandlade rutorna i försöken. Totalt var det bladprover tagna vid fem tillfällen från tre försök med fyra block i varje försök och från en A-ruta i varje block (tabell 1).

Tabell 1. Provtagningsplan. Försöksplatser, utvecklingsstadium och provtagningsstidpunkter i A-rutor i växtskyddsförsök 2010,

Försöksplats		Datum	
	3 juni	4 juni	16 juni
Håberg (H)		DC37	
Bränneberg (B)		DC37	
Labäck (L)		DC37	
Forstena (F)	DC37		DC47

I försöken togs plantor från de fyra obehandlade leden (A-rutorna) i respektive block. Plantorna togs med in till ett laboratorium, där bladen graderades okulärt. Från vardera led togs tio blad ut från respektive bladnivå ett till fyra. Bladnivån räknades uppifrån. Den okulära graderingen utfördes på ett bord inne på laboratoriet enligt den metod som används i försöksverksamheten (EPPO, 2004). För varje blad och bladnivå graderas angreppsgraden av bladfläcksvampar i intervallen: 0, 0,1-1, 1-5, 5-10, 10-25, 25-50, 50-100 % angripen bladyta, samt vissna blad. Endast blad med synbara angrepp torkades och sparades för senare PCR-analys. De sjukdomar som graderades okulärt var svartpricksjuka (*S. tritici*), vetets bladfläcksjuka (*D. tritici-repentis*), mjöldagg (*Erysiphe graminis*), brunrost (*Puccinia recondita*) och gulrost (*Puccinia striiformis*).

Proverna från respektive försöksplats, bladnivå samt angreppsnivå sammanfördes till ett samlingsprov. Totalt analyserades 43 st. prov. Antal bladprover, provtagningstillfällen och angreppsgrad från de olika försöksplatserna finns redovisade i tabellbilagan.

Proverna skickades sedan till ScanBi Diagnostics AB, Alnarp för analys och analyserades enligt den tidigare utvecklade PCR- tekniken för sjukdomarna svartpricksjuka (*S. tritici*), vetets bladfläcksjuka (*D. tritici-repentis*) och brunfläcksjuka (*S. nodorum*) (Almqvist et al, 2008)

PCR- tekniken bygger på att en för varje växtpatogen specifik DNA sekvens mångfaldigas, så att den kan detekteras i fall att den sökta patogenen finns i provet (Almqvist et al. 2008). Den art-specifika DNA-strängen lokaliseras med s.k. primrar bestående av en för den undersökta arten unik DNA-sekvens. Med hjälp av enzym byggs nya kopior av denna DNA-sträng upp tillsammans med en så kallad probe och den art-specifika DNA-strängen kombineras med ett fluorescerande ämne. Efter ett visst antal kopieringsomlopp/cykler, s.k. Ct, går det att detektera den frigjorda fluorescensen som ett mått på den ursprungliga mängden artspecifikt DNA. Ett högt Ct värde innebär många fördubblingscykler och motsvarar alltså en vid starten av analysarbetet liten mängd av den specifika DNA-sekvensen, dvs. svagt angrepp av patogenen. För att kunna göra en kvantifiering av mängden patogen måste resultaten från PCR-analysen normaliseras mot en växtreferensgen och relateras till ett kontrollprov med ett bestämt innehåll av patogenen, s.k. relativ kvantifiering. I detta fall användes en vetegen som referensgen. Kontrollproven för de tre patogenerna och för vetet utgjordes av DNA- extrakt från renkulturer av patogen respektive frisk vete. Kvantifieringen ger ett värde som anger hur många gånger högre halten är i provet jämfört med kontrollprovet och beskrivs med värdet $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Om värdet på $2^{-\Delta\Delta Ct}$ till exempel är 100 betyder det att det finns 100 gånger mer patogen DNA i provet jämfört med kontrollprovet. Med hjälp av kunskap om genomets storlek kan man sedan beräkna hur många genom kontrollprovet innehåller och få värden som gör det möjligt att justera $2^{-\Delta\Delta Ct}$ och kunna jämföra förekomsten mellan respektive svamppatogen.

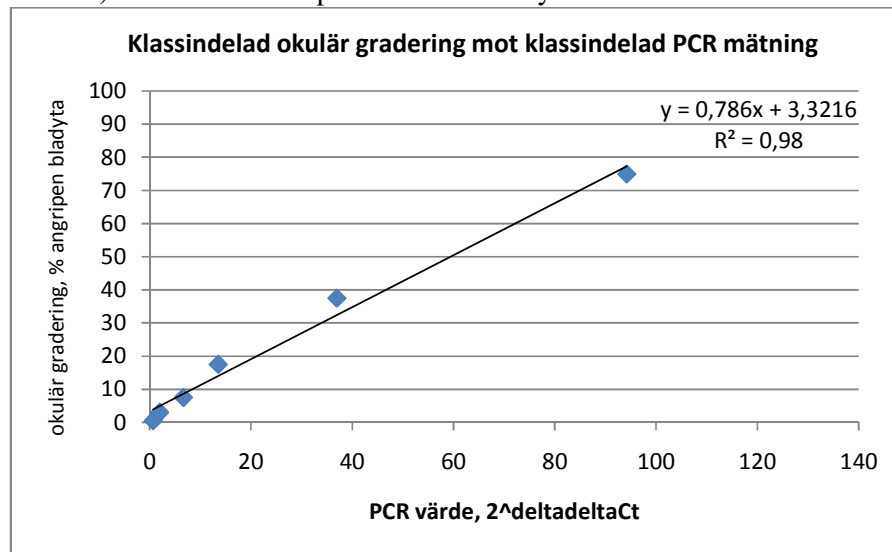
PCR analysen samt bearbetning av de erhållna värdena från PCR-analysen har utförts av Anders Dahlqvist på Scanbi diagnostics och Charlotta Almqvist, precisionsodling och pedometri, inst. för mark och miljö, SLU. Resultaten från de okulära graderingarna och PCR analysen har sedan jämförts med varandra med hjälp av korrelations- och regressionsanalys i Excel 2010.

Resultat

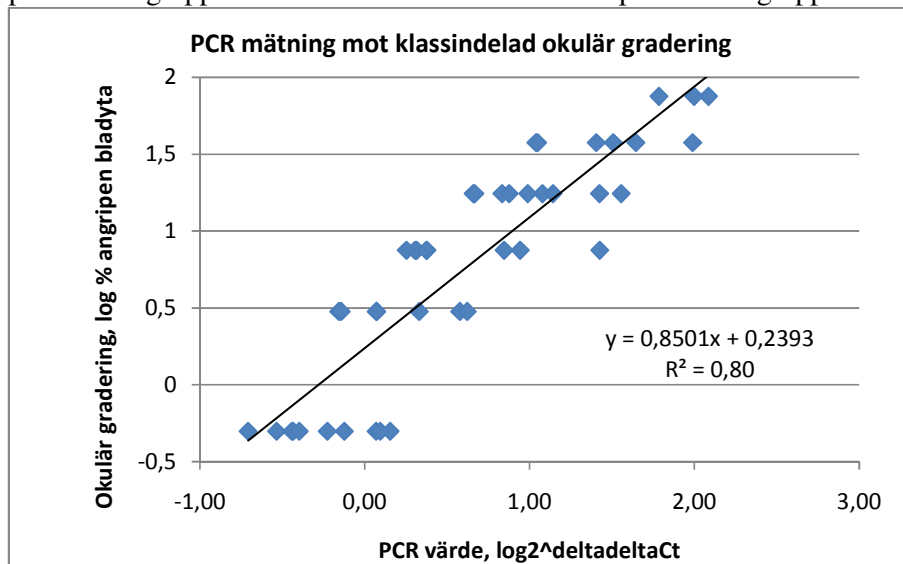
Vid PCR analysen detekterades *S. tritici* i samtliga 43 prover, *S. nodorum* i 22 prov och *D.tritici-repentis* i åtta prov. I 22 prov fanns enligt PCR analysen både *S. tritici* och *S. nodorum*. I sju prov samtidigt *S. tritici*, *S. nodorum* och *D.tritici-repentis*, och i ett prov samtidigt *S. tritici* och *D.tritici-repentis* (se tabellbilaga). Förekomsten av *S. tritici* var med få undantag mycket större än av *S.nodorum* och *D.tritici-repentis*. På en försöksplats detekterades ingen *S. nodorum* och infektionen av *D.tritici-repentis* var låg. I den okulära graderingen konstaterades inte på någon plats något angrepp av *S. nodorum* eller *D. tritici-repentis*, utan enbart angrepp av *S. tritici*. Detta innebär att endast sambandet mellan uppmätta PCR-värden och okulär gradering av *S. tritici* undersöktes. Eftersom den okulära bedömning är en klassning och redovisas som klassmedel har en beräkning gjorts av sambandet mellan okulär klass och medeltal för PCR-värdet i respektive klass. R²-värdet blev för detta samband 0,98.(figur 1)

I figur 2 redovisas samtliga prover för att beskriva spridningen i varje klass och även visa förekomsten av angreppnivå vid låga okulära graderingar.

Figur 1. Samband mellan okulär gradering (medel för klassen) och PCR-värde (medel för klassen) för *S. tritici* i 43 prover från växtskyddsförsök 2010.



Figur 2. Sambandet mellan PCR-värdet ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) och okulärt bedömd angripen bladyta (medel för klassen) för *S. tritici* i 43 prover från växtskyddsförsök 2010. På y axeln motsvarar noll en procents angrepp och värdet två motsvarar hundra procents angrepp.



Diskussion

I alla försöken och i flertalet av enskilda bladprover dominerade *S. tritici*. Beräkningarna visar på en mycket god samstämmighet, $R^2=0,98$, mellan klassindelad okulär gradering och klassmedel av den relativa kvantitativa PCR-bestämningen av proverna från dessa klasser (figur 1). Eftersom gradering av *S. nodorum* och *D.tritici-repentis* saknades, patogenerna upptäcktes ej vid graderingen, så kunde ingen korrelation beräknas för okulär gradering och PCR för dessa svampar.

När sambandet beräknades på liknande sätt som i tidigare undersökningar (figur 2) är $R^2=0,80$ och resultatet i paritet med tidigare observation av *S.tritici*, med $R^2=0,75$, respektive $R^2=0,83$ för *D.tritici-repentis* i försök med låg "blandinfektion" (Almquist et al, 2008). Det verkar alltså vara likartade samband mellan PCR-värde och okulär gradering vare sig den görs på samma material som den okulära, eller på material som delats ned och analyserats vara för sig. Nackdelen med att analysera på samma material är att risken för kontaminering ökar något vilket skulle kunna ge låga "falska" förekomster. Fördelen med att hantera ett mindre antal prov kan överväga men valet mellan att ta ett eller två separata prover blir främst beroende på frågeställning som skall besvaras.

PCR-tekniken har fördelen att kunna upptäcka mycket låga även subkliniska halter av patogener. Om det är intressant att följa infektionsförlopp, så är upplösningen mycket bra med PCR-tekniken vid låga förekomster (figur 2), men då rekommenderas separata prover och aseptisk teknik i fält för att reducera risken för kontaminering. Den teoretiska detektionsgränsen är en spor i provet. (Almqvist et al. 2008).

Resultaten pekar också tydligt på problemet med blandinfektioner och okulär gradering. Även om *S.tritici* dominerade så var angreppet av *S. nodorum* i samma nivå på en bladnivå på en försöksplats, Forstena. *S. nodorum* förekom även frekvent på två försöksplatser men saknades helt i ett försök. Resultaten av PCR-bestämningar visade också på att det förekom fler blandinfektioner också av *D.tritici-repentis*, något som inte heller upptäcktes i den okulära graderingen. Eftersom de tre bladpatogenerna har olika spridningsbiologi och olika känslighet (resistens) mot olika fungicider så finns det ett behov av en säker diagnos av en bladinfektion i många typer av fältförsök med vete.

Resultaten i denna undersökning stärker slutsatsen från det tidigare SLF-projektet ”Gradering av patogenangrepp i vete med kvantitativ PCR-metodik” (Almqvist et al. 2008). Nämligen att PCR-tekniken ger avsevärt förbättrade möjligheter att selektivt följa angrepp av olika bladpatogener i fältförsök och växande grödor. En viktig fråga är också hur väl PCR-värden från en relativ kvantifiering kan jämföras med varandra. Utgångspunkten för möjligheterna till en sådan jämförelse med den här använda tekniken bygger på kunskap om sambandet mellan den använda detektionssekvensen, storleken på genomet, cellens DNA-mängd och innehållet av patogen DNA i kontrollprovet. De tre patogenerna har ungefär lika stora genom, ca 38 Mb, så att när lika stora mängder DNA används i kontrollproven kan resultaten jämföras som 1:1:1 (Almqvist et al. 2008).

När PCR-tekniken anammas så kommer flera av problem med okulärbesiktning att reduceras och slutsatserna från sortförsök och fungicidförsök att förbättras avsevärt.

Referenser:

Försökshandboken 2012: 74-77 <http://www.slu.se/faltforsk>

EUROPAPARLAMENTETS OCH RÅDETS DIREKTIV 2009/128/EG 71:86.
Europeiska unionens officiella tidning L 309 71:86

EPPO standards PPI. 2004. Efficacy evaluation of fungicides and bactericides. 2 nd Edition. 2:32-40

Almqvist C., Lerenius C., Filipsson C., Jonsson A. 2008. Bestämning av förekomst av patogena svampar i vete med PCR teknik, rapport 18 2008 , SLU Skara.

Fraaije B.A, Lovell D.J, Rohel E.A, Hollomon D.W. 1999. Rapid detection and diagnosis of *Septoria tritici* epidemics in wheat using a polymerase chain reaction/PicoGreen assay. Journal of Applied Microbiology 86:701-708.

Fraaije B.A, Lovell D.J, Coelho J.M, Baldwin S. and Hollomon D.W. 2001. PCR-based assays to assess wheat varietal resistance to blotch (*Septoria tritici* and *Spagnospora nodorum*) and rust (*Puccinia striiformis* and *Puccinata recondite*) diseases. European Journal of Plant pathology 107:905-917

Fraaije B.A, Lovell D.J, Coelho J.M, Baldwin S. 2002. Septoria epidemics on wheat: combined use of visual assessment and PCR-based diagnostics to identify mechanisms of disease escape. Plant Protection Sciences 38:421-424.

Guo J-R, Schneider F, Verreet J-A. 2006. Presymptomatic and quantitative detection of *Mycosphaerella graminicola* development in wheat using real-time PCR assay. FEMS Microbiology Letters 262:223-229.

Guo J-R, Schneider F, Verreet J-A. 2007. A real-time PCR assay for quantitative and accurate assessment of fungicide effects on *Mycosphaerella graminicola* leaf blotch. Journal of Phytopathology 155:482-489.

Rohel E.A, Laurent P, Fraaije B.A, Cavaelie N, Hollomon D.W. 2002. Quntitative PCR monitoring of the effect of azoxystrobin treatements on *Mycospaerella graminicola* epedemics in field. Pest Management Science 58:248-254.

Tabellbilaga								
Prov	Plats	Bladnivå	klass	Provtagnings datum	Antal blad i provet	PCR		
			% angrepp okulärt			2-ΔΔ-Ct, <i>S. tritici</i>	2-ΔΔ-Ct, <i>S. nodorum</i>	2-ΔΔ-Ct, DTR
1	Håberg	2	0,55	2011-06-04	6	0,36107		0,26554
2	Håberg	2	3	2011-06-04	4	1,17651		
3	Håberg	3	0,55	2011-06-04	1	1,42614		
4	Håberg	3	3	2011-06-04	11	1,18273		
5	Håberg	3	7,5	2011-06-04	12	2,0671		
6	Håberg	3	17,5	2011-06-04	9	4,55487		
7	Håberg	3	37,5	2011-06-04	1	10,95529		
8	Håberg	4	7,5	2011-06-04	1	2,02016		
9	Håberg	4	17,5	2011-06-04	7	6,81615		
10	Håberg	4	37,5	2011-06-04	2	25,43658		
11	Bränneberg	2	0,55	2011-06-04	5	0,36789		
12	Bränneberg	3	0,55	2011-06-04	7	0,75233		0,00283
13	Bränneberg	3	3	2011-06-04	15	3,77411		
14	Bränneberg	3	7,5	2011-06-04	8	2,37889		
15	Bränneberg	3	17,5	2011-06-04	4	26,62897		
16	Bränneberg	3	75	2011-06-04	2	121,89935		
17	Bränneberg	4	17,5	2011-06-04	1	36,01533		
18	Bränneberg	4	37,5	2011-06-04	5	32,24902	0,0079	0,00114
19	Bränneberg	4	75	2011-06-04	14	99,70952	0,03063	
20	Labäck	2	0,55	2011-06-04	8	0,19586	0,01129	
21	Labäck	2	3	2011-06-04	3	0,6964	0,0204	
22	Labäck	3	0,55	2011-06-04	4	0,40058	0,03081	0,61216
23	Labäck	3	3	2011-06-04	13	2,14145		
24	Labäck	3	7,5	2011-06-04	13	2,37288	0,05193	
25	Labäck	3	17,5	2011-06-04	7	4,65434	0,02352	
26	Labäck	3	17,5	2011-06-04	3	11,99		
27	Labäck	4	7,5	2011-06-04	2	26,69817	0,27449	
28	Labäck	4	17,5	2011-06-04	7	9,7568	0,13702	0,00844
29	Labäck	4	37,5	2011-06-04	2	44,23734	0,45966	
30	Forstena	2	0,55	2011-06-03	2	1,1743	1,5043	
31	Forstena	3	0,55	2011-06-03	7	0,59286	0,10691	
32	Forstena	3	3	2011-06-03	16	4,18779		
33	Forstena	3	7,5	2011-06-03	2	7,01969		
34	Forstena	4	7,5	2011-06-03	13	8,78492	0,74574	
35	Forstena	4	17,5	2011-06-03	12	13,89758	0,0549	
36	Forstena	4	37,5	2011-06-03	9	97,72759	7,81673	0,01861
37	Forstena	3	0,55	2011-06-16	11	0,2923	0,08384	
38	Forstena	3	3	2011-06-16	11	0,71989	0,4579	
39	Forstena	4	0,55	2011-06-16	1	1,2396	1,08507	0,83334
40	Forstena	4	7,5	2011-06-16	5	1,79048	0,59025	
41	Forstena	4	17,5	2011-06-16	6	7,52561	0,22368	0,02101
42	Forstena	4	37,5	2011-06-16	3	11,19	0,16199	
43	Forstena	4	75	2011-06-16	16	61,0449	8,85665	0,02315