

Prognos av växtsjukdomar baserad på molekylära metoder och sporfällor

Projektnummer: H1233053

Projektansvarig: Jonathan Yuen

Medsökande: Anna Berlin

Bakgrund

Flera olika växtskadegörare sprids med hjälp av vindburna sporer (West, 2008), och växtsjukdom kan utvecklas om sporer landar på en mottaglig värdväxt vid gynnsamma förhållanden. När under säsongen som sporer frigörs är avgörande för om de skall orsaka sjukdom eller inte. Prevention, det vill säga minskning av förekomsten av växtpatogener, är det bästa sättet att undvika spridning, uppförökning av inokulum och ekonomiska förluster till följd av växtsjukdomar. Det är därför viktigt att detektions- och diagnostikmetoden är robust, precis och känslig (Jackson, 2011).

Ofta kan sjukdomar förutsägas med hjälp av olika klimatmodeller, men för att dessa modeller skall stämma krävs det att det finns livskraftigt inokulum tillgängligt. Vi vet att klimatet kommer att förändras, vilket kommer att innebära att även förekomsten och frekvensen av olika växtpatogener förändras (Garrett, 2011), men det är i princip omöjligt att förklara hur den förändringen blir. Att kunna undersöka när och var en patogen finns i luften är viktigt för att på ett tidigt stadium kunna bedöma risker för angrepp i grödor och möjligheter att snabbt vidta motåtgärder.

Syftet med studien var att undersöka vilken metod som är lämpligast för detektion av växtpatogener från olika typer av sporfällor samt under vilka perioder olika arter finns i luften och relatera information från sporfällorna till utvecklingen av respektive sjukdom i fält. Flera växtpatogener sprids via luft och vind. Genom att samla in material från luften med hjälp av olika typer av sporfällor, studeras den generella svampfloran i luften. Detta för att ge svar på när olika patogener är luftburna och kan spridas till värdväxter. En jämförelse mellan olika sporfällor är viktig då fällan måste samla in ett representativt prov för analys, vilket är nödvändigt om metoden ska kunna användas i prognossyfte. Informationen användas är en viktig del utveckling av prognosmodeller för olika växtsjukdomar. Prognoser är en viktig komponent i implementeringen av direktivet om hållbar användning av bekämpningsmedel och integrerat växtskydd.

Material och metoder

Insamling av material

De sporfällor som användes i denna studie var två passiva fällor: tratt-fälla (JB-fälla), filterpapper fälla och två aktiva: joniserande fälla och Hirst-fälla med eppendorfrör (Figur 1). JB- och filterpapper-fällorna är passiva fällor där ingen

energi behövs för att samla in proverna, medan både joniserande och Hirst-fällan är aktiva fällor som behöver el för att sug in luft och samla in material.



Figur 1. Alla typer av sporfällor som användes i projektet på Bio Centrums tak, Ulutna, Uppsala. 1: joniserande fälla, 2: Hirst-fälla, 3: filterpapper-fälla och 4: tratt-fälla eller JB-fälla

Sporfällor placerades i fyra viktigaste odlingsområdena i södra Sverige (Figur 2): Ultuna, Uppland, Kölbäck, Östergötland, Lanna, Västergötland och Alnarp, Skåne. Provtagningen pågick mellan slutet av april – början av maj till och med november båda åren. Prover skickades med Frisvar till SLU, Ultuna under provtagningsperioden.

Sporfällorna på Bio centrums tak på Ultuna, var igång hela året för att få en referens på hur svampfloran varierar över alla säsonger. Alla olika typer av fällor som användes i studien var representerade på BioCentrums tak, se fotot i Figur 1.



Figur 2. Placering av sporfällor 2013 och 2014.

Molekylär identifiering av svampar

Metagenomik är "studien av mikrobiella samhällen i miljö-prover". För svampstudier är detta speciellt intressant i relation till växtpatogenerns utbredning, invasiva arter och biodiversitet. Växtpatogener kan spridas med jord, utsäde, vektorer som till exempel insekter eller nematoder och med hjälp av vindar.

I denna studie har vi använt oss av en allmän DNA baserad metod för att detektera svampar som grupp. Vi använde oss av nya sekvenseringstekniker med hög kapacitet (på engelska benämns detta ofta som "high throughput sequencing") där hela svampsamhället analyseras. Metoden kan användas på olika typer av prover och ger data om bakgrundsnivå av svampförekomst, temporär och spatial variation av svampar, möjliggör detektion av nya arter. Resultatet är semi-kvantitativt.

För att identifiera svampar molekylärt, används en sk "streckkods"-region organismens DNA, och för svampar har ITS-regionen (ribosomal Internal Transcribed Spacer) valts som streckkods-region (Schoch, 2012). ITS sekvensen finns i flera kopior i genomet och är variabel mellan arter men inom en art är variationen låg. ITS regionen har använts under lång tid och är välrepresenterad i olika databaser. Det går att använda samma metod för andra organismer och andra gener.

Metoden går ut på att med hjälp av svampspecifika primrar i en PCR klippa ut

och uppföröka alla ITS sekvenser i ett prov. Proven polas därefter och alla prover sekvenseras därefter med hjälp av en av de tillgängliga mass-sekvenseringsmetoderna. Varje prov har "taggats" med en specifik sekvens, vilken i dataanalysen används för att identifiera vilka sekvenser som kommer från de olika proven. Varje art eller artgrupp bildar en unik "OTU" (operational taxonomic unit), och den vanligaste sekvensen inom OTUn jämförs med ITS sekvenser på redan identifierade prover i en databas, till exempel Unite-databasen (Abarenkov *et al.*, 2010; Nilsson *et al.*, 2014). Varje OTU får en art-tillhörighet och en lista med arter funna i varje prov. Problemen i detta steg är att i vissa databaser är många sekvenser fel identifierade och det finns många sekvenser som ännu inte har blivit sammankopplade med en specifik art. Ibland kan skillnaderna mellan en art vara små, för växtpatologi är *Fusarium*-komplexet ett sådant exempel där endast identifiering till släktesnivå är möjligt baserad på ITS regionen.

Avvikelser från ursprungliga projektplanen

Test av olika sekvenseringsmetoder

Utvecklingen av sekvenseringsmetoder har under det senaste årtiondet gått väldigt snabbt. När vi ansökte om projektet var 454 eller pyrosekvensering det senaste inom samhällsanalys. De instrument som sekvenserar med hjälp av 454 tillverkas inte längre, och den har numera ersatts av nya metoder; Illumina tekniken, Ion Torrent och PacBio.

Eftersom vi i detta projekt var intresserade av att detektera små mängde svamp-DNA, gjordes även en undersökning om de olika sekvenseringsmetodernas möjlighet att detektera svampar. Generellt uppförökas och sekvenseras korta sekvenser lättare än längre. Eftersom svampar vars "streckkod" kraftigt varierar i längd (Ihrmark, 2012), blir svampar med korta ITS-regioner vanligare än svampar med långa ITS-regioner. Risken är då att svampar med långa "streckkods"-sekvenser hamnar under detektionsnivån och antas inte kunna bekräftas.

Eftersom Roche avslutat sin tillverkning av deras produkt för pyro- eller 454-sekvensering, testade vi Illumina, Ion Torrent och PacBio plattformarna. Detta gjordes för att vi ville undersöka i vilken grad sekvenseringsmetoden påverkar detektionsförmågan av växtpatogena svampar. Eftersom mögel- och jästsvampar dominerar i luftens svampflora, är det intressant att veta när en sekvens är "riktig" jämfört med om den är en falsk positiv. Därför testades en pool med 4 kända sekvenser blandade med en pool av sporfälleprover. Vi valde att satsa på detta eftersom det då också skulle öka möjligheten att kvantifiera olika svamparter i provet, och har hittills inte testat någon qPCR för detektion och kvantifiering av enstaka arter som till exempel *Puccinia graminis*, vilken orsakar svartrost på spannmål.

Samarbete för bättre

Projektet har haft ett nära samarbete med ett liknande projekt inom skogspatologi om invasiva arter och spridning av skogs-patogener (Jonas Oliva och Johanna Bobergs projekt "Utveckling av en strategi för att detektera och reagera mot invasiva skogspatogener i Sverige", Formas diariernr 2012-1255).

Tillsammans har projekten varje vecka samlat in prover från 45 olika sporfällor placerade i åtta olika områden mellan maj – oktober 2013 och 2014. Projekten samarbetar också när i testning och utveckling av analysmetoder för sekvensdata.

Förseningar i sekvensering och dataanalys

Själva poolerna för sekvenseringen blev försenade på grund av Annas föräldraledighet. Därefter tog det längre tid än normalt innan resultaten var klara på SciLife Lab. Den data som producerats av projektet består av flera, mycket stora datafiler som skall jämföras med varandra och sammanfogas till en stor tabell. Vid institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi har en, speciellt anpassat efter svamp-samhällen, pipe-line för dataanalysen utarbetats vilken baseras på programmet SCATA (www.mykopat.se/scata) (Brandström Durling, 2011). Eftersom vårt projekt är ett av de första där så många filer och olika typer av sekvenseringsdata skall sammanfogas i en analys, har analysen hittills kraschat och programmet har spontant avslutats varje gång vi startat en analys. Detta trots flertalet försök att anpassa analysutrymme och parametrar. Vårt nästa steg är att använda andra sk klustrings-program, vilka inte gör lika noggranna jämförelser, för att titta på hela samhällsstrukturen över alla år och sporfällor tillsammans med data från skogssjukdoms-projektet.

Resultat

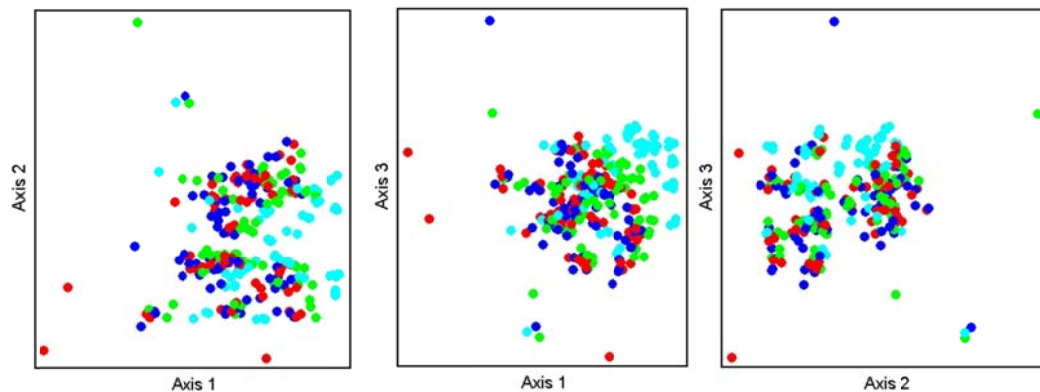
I projektet har vi testat olika sporfällor och sekvenserings metoder för att förstå hur växtpatogena svampar på det mest konstandseffektiva sättet kan samlas och analyseras för övervakning.

Vi har visast att det är möjligt att identifiera svampar med den valda metoden. Mögel- och jästsvampar är de allra vanligast förekommande svamparna. Det finns skillnader i svampsamhället mellan olika sporfällor från samma plats, till exempel påträffades insekts-associerade svampar i sugfällorna. Timing av detektion beror på svampens biologi.

Material samlades in under två växtodlings år, 2013 och 2014, från slutet av april/början av maj till och med början av november. Dessutom pågick insamlingen året runt på en av insamlingsplatserna för att undersöka svampförekomsten i luften vintertid.

Utvärdering av sekvenseringsmetoder

Genom att använda sporfälle-prover från en säsong och inkludera fyra sekvensfragment av olika längd, sekvenserades dessa pooler på de fram till nu fyra tillgängliga sekvenseringsplattformarna. Resultatet visar tydligt att de olika metoderna ge olika svar på hur svampsamhället är sammansatt. I figur 3 visas resultat från en NMDS (Non-metric multidimensional scaling), de röda prickarna representerar OTUs sekvenserade med 454/pyrosekvensering, de gröna OTUs sekvenserade med Ion Torrent PGM, de turkosa Illumina MiSeq och de blå prickarna är OTUs sekvenserade med PacBio RS II. I stora drag ger 454/pyrosekvensering och PacBio RS II likande resultat, medan Ion Torrent tydligt misslyckas med att detektera de långa sekvenserna. Illumina MiSeq lyckas detektera de långa sekvenserna, men de är kraftigt underrepresenterade i antal jämfört med korta sekvenser.



Figur 3. NMDS (Non-metric multidimensional scaling) där alla prover inkluderats, 454/pyrosekvensering (röd), Ion Torrent PGM (grön), Illumina MiSeq (turkos) and PacBio RS II (blå). Klustrings-avståndet var 1,5%

Baserat på dessa resultat valde vi att sekvensera alla prover med både Illumina MiSeq och Pac Bio RS II. Illumina MiSeq data ger oss djup i antalet arter som kan detekteras och Pac Bio RS II ger en möjlighet att få ett robust data set med färre totalt antal sekvenser, men mindre snedvridning i antal på grund av längd. Slutligen rekommenderar vi att undvika användning av Ion Torrent PGM för svampsamhälles-analys, eftersom den plattformen gav missvisande resultat och inte kunde detektera svampar med långa ITS-regioner.

Utvärdering av olika typer av sporfällor

Högt placerade fällor samlar in generell sporflora och lågt placerade sporfällor samlar in den lokala sporfloran. Fyra olika sporfällor testades, och vi valde att använda högt placerade fällor och en lågt placerad fälla vid varje lokal. De lågt placerade fällorna var i största möjliga mån placerade vid växtskyddscentralernas progons- och varningsfält. Detta gör att vi kan jämföra vad som hittas i sporfällorna med vad som verkligen fanns i fält.

De olika sporfällorna fångar olika typer av svampar, och eftersom tömningen skedde 1 gång per vecka, finns möjligheten att DNA i döda sporer degraderats och därför inte kunde detekteras.

Exempel på detekterade växtpatogena svampar:

Puccinia coronata (orsakar kronrost på havre), *Alternaria* sp., *Puccinia graminis* (svartrost), *Fusarium* sp. *Claviceps purpurea* (mjöldryga), *Cochliobolus sativus* (Bipolaris bladfläck)

Exempel på detekterade skogspatogena svampar:

Thekopsora areolata (häggrost), *Melampsora pinitorqua* (tallrost), *Heterobasidium annosum* (rottröta), *Melampsorium betulinum* (björrost) *Cronartium flaccidum* (törskatesvamp), *Melampsora larici-populina* (rost på salix).

Tidpunkten för detektion av specifika arter i högt placerade fällor respektive lågt placerade fällor skiljer sig mellan olika växtpatogena svampar. I tabell 1 visas

några exempel på när respektive patogen detekterades i sporfällorna placerade på Alnarp. Detektionstidpunkten följer den förväntade livscykeln av de exemplifierade svamparna. Till exempel förväntas *P. graminis* vara vindspridd och detekteras också först i de högt placerade fällorna, därefter i de lågt placerade fällorna.

Tabell 1. Resultat från sporfällorna i Alnarp 2010. Varje provtagningstillfälle representerar en vecka, där "X" visar när sekvenser av respektive art hittades i den passiva tratt-fällan och de färglagda fälten när samma art hittades i sugfällan.

	maj		juni			juli		augusti		
<i>Fusarium</i> sp.										X
<i>Claviceps purpurea</i>	X	X	X	X	X		X			X X
<i>Puccinia graminis</i>							X	X	X	X X X
<i>Alternaria</i> sp.		X	X	X	X	X	X			

Diskussion

Det är möjligt att detektera svampar, inklusive växtpatogena svampar i prover insamlade med hjälp av sporfällor. Val av sporfälle-typ samt på vilken höjd sporfällan placeras påverkar vilka svampar som fångas. Nya sekvenseringsmetoder (High throuput sequencing) är ett kraftfullt verktyg för denna typ av övervakning, även om det är viktigt att vara medveten om begränsningarna för tekniken, och beroende på vilken fråga som skall besvaras eller patogen övervakas, krävs ytterligare utveckling och anpassning av metoderna.

Art identifiering är beroende av befintliga databaser och kan aldrig detektera arter som inte är inkluderade i referensdatabasen. Generellt domineras svamppopulationen i luften av mögel och jäst svampar. I denna studie samlades prover in veckovis, vilket betyder att vissa sporer inte kan överleva i till exempel solljus eller fukt under så lång tid, utan dör och potentiellt kan deras DNA degraderas. För att förfinna metoden bör det undersökas om blad kan användas som sporfällor, vilka vindburna växtpatogener som fastnar och orsakar sjukdom.

Fortsatta aktiviteter

Arbetet med att slutföra dataanalyserna och publikationerna kommer att utföras under våren, och vi förväntar oss att publikationerna är accepterade under 2017. Anna har deltagit i en publikation där svampars "streckkod"-sekvenser granskade av taxonomiskt kunniga forskare samlas i en databas (Nilsson et al. 2014). Detta har skapat en mycket bra grund för fortsatt analys och utvärdering av luftens svampflora, med specifik inriktning på växtpatogena svampar.

Publikationer

Berlin, A., Ihrmark, K., Vinnere-Pettersson, O., Tellgren-Roth, C., Lindahl, B., Klemmensen, K., Stenlid, J., Brandström-Durling, M. Length dependent biases in high throughput sequencing technologies can introduce false shifts in fungal community compositions. *in prep.*

Oliva, J., Boberg, J., and Berlin, A. Comparison between fungal air communities in agricultural and forests ecosystems. *in prep.*

Berlin, A. et al. Correlation between fungal field infections and fungi found in spore trap catches. *in prep.*

Slutsatser

Det är möjligt att detektera och identifiera växtpatogena svampar från sporfällor. Resultat från denna studie ger en bred bad för anpassning av metoder för specifika frågeställningar. De tre viktigaste frågorna att beakta i utvecklingen av en metod är:

- Val av sporfälletyp påverkar vilka svampar som fångas
–välj sporfälla baserat på vilken eller vilka patogener som är av intresse
- Sporfällans placering är viktig att beakta
– Är det viktigt att övervaka vad som händer på en specifik plats? -Placera fällan lågt. Sker övervakningen för ett större område? –Placera fällan högt.
- Sekvenseringsmetoden kan påverka vilka arter som detekteras
-Utvecklingen inom molekylärbiologin sker otroligt snabbt. Vid val av detekteringsmetod, var medveten om metodens för och nackdelar. Vilka arter som kan eller inte kan detekteras och vilken säkerhet detektionsmetoden har.

Resultatförmedling till näringen

Under projekttiden har flera olika aktiviteter utförts för att kommunicera resultaten med näringen och övriga intressenter.

Kommunikationskanal	Motivering av kommunikationskanal och huvudsakliga mottagare	Genomförd aktivitet
Odlarmöten och regionala växtskyddskonferenser	Redovisning av och diskussion kring. Lantbrukare, rådgivare samt branchorganisationer	Projektet har presenterats t ex vid ämneskommitteens för växtskydds årliga möte 2014
Internet, institutionens hemsida	Redovisning av och diskussion kring resultat för att upprätthålla projektets relevans. Allmänheten, rådgivare samt branchorganisationer	http://www.slu.se/institutioner/skoglig-mykologi-vaxtpatologi/forskning/epidemiology/detektion-av-vaxtpatogener-baserad-pa-information-fran-sporfallor/ (2016-12-22)
Referensgrupp	Möten där projektets resultat presenteras och diskuteras	Ett fysiskt mycket givande möte på Ultuna 11 april 2013, där projektets upplägg diskuterades. I övrigt kommunikation via e-

		post
Internationell forskningsmiljö	Presentera resultaten under en relevant vetenskaplig konferens	NJ Fakultetsdagen, 24 september 2014, Ultuna NJF seminarium 468, 30 oktober 2013, Kristianstad
Internationella tidskrifter	Internationell publicering i granskad vetenskaplig tidskrift, forskare	3 artiklar förbereds för publicering

Referenser

- Abarenkov K, Henrik Nilsson R, Larsson K-H, Alexander IJ, Eberhardt U, Erland S, Høiland K, Kjølner R, Larsson E, Pennanen T, et al. 2010.** The UNITE database for molecular identification of fungi – recent updates and future perspectives. *New Phytologist* **186**(2): 281-285.
- Brandström Durling M, Clemmensen, K. E., Stenlid, J., and Lindahl, B. 2011.** SCATA - An efficient bioinformatic pipeline for species identification and quantification after high-throughput sequencing of tagged amplicons. *submitted*.
- Garrett. 2011.** Complexity in climate-change impacts: an analytical framework for effects mediated by plant disease. *Plant Pathology* **60**: 15-30.
- Ihrmark K, Bödeker, I. T. M., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenk, J., Strid, Y., Brandström-Durling, M., Clemmensen, K. E., and Lindahl, B. D. 2012.** New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology*.
- Jackson SL, Bayliss, K. L. 2011.** Spore traps need improvement to fulfil plant biosecurity requirements. *Plant Pathology*.
- Nilsson RH, Hyde KD, Pawłowska J, Ryberg M, Tedersoo L, Aas AB, Alias SA, Alves A, Anderson CL, Antonelli A, et al. 2014.** Improving ITS sequence data for identification of plant pathogenic fungi. *Fungal Diversity* **67**(1): 11-19.
- Schoch CL, Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, A., Chen, W., and Fungal Barcoding Consortium. 2012.** Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS*.
- West JS, Atkins, S. D., Emberlin, J., and Fitt, B. D. L. 2008.** PCR to predict risk of airborne disease. *Trends in Microbiology* **16**(8): 380-387.