

Slutrapport

'Kartlägga och bekämpa fruktträdskräftan i Sverige'

Projektnummer: V1036010

Larisa Gustavsson

Sammanfattning

Svampsjukdomen fruktträdskräfta (*Neonectria ditissima*) utgör ett stort problem för svenska äppelodlare. Under vissa år kan hastigt uppblossande sjukdomsutbrott utplåna hela odlingar av unga äppelträd. Vi har utfört inokuleringar på avklippta kvistar och ettåriga träd. Utfallet av detta projekt blev ny kunskap om genetiska skillnader i mottaglighet mot kräfta för 78 sorter (inklusive nummersorter), 4 grundstammar och 3 vilda arter. Vi har identifierat nya resistenskällor, vidareutvecklat en metod för att påvisa kräfta i ved av äppelträd samt etablerat oss som en viktig partner i internationella nätverk. Projektet har genomförts i nära samarbete med odlare, odlarrådgivare, växtförädlare i Sverige och Norge, samt kollegor i Holland, Belgien och Nya Zeeland. Dessutom har detta projekt nära kopplingar till det EU-finansierade projektet 'FruitBreedomics' och det PPP-finansierade projektet 'NordApp'. Flera nya projekt har utvecklats baserat på den kunskap vi tagit fram under dessa fyra år.

Bakgrund

Svenska konsumenter efterfrågar lokalt producerade äpplen av hög kvalitet. Men bara omkring 20% av de konsumerade äpplena odlas inom landet. Idag är äppelodling en viktig och alltmer ökande del inom trädgårdsnäringsen, men svensk äppelproduktion möter stora utmaningar orsakade av sjukdomar och skadegörare. En av de mest allvarliga sjukdomarna är fruktträdskräfta, som orsakas av svampen *Neonectria ditissima* (tidigare känd som *Nectria galligena*). Sjukdomen gynnas av vårt relativt svala och regniga klimat. Denna sjukdom är också ett stort och akut problem i många andra europeiska länder, framför allt i norra Europa. Skador orsakade av *N. ditissima* kan vara enorma. Eftersom kraftigt sjuka träd smittar andra närstående friska träd, måste de tas ut från odlingen och ersättas med nya. Ibland måste man ta bort hela odlingar av speciellt känsliga sorter som exempelvis Elise redan 12-13 år efter etableringen vad bara är ungefär halva produktionstiden för en normal äppelodling. Med tanke på de höga kostnaderna för etablering av en ny fruktodling (i genomsnitt 400 tkr/ha), har kräfta blivit en sjukdom som hotar äppelproduktionen inte bara i Sverige men också i stora delar av Norra Europa. I Nederländerna och Belgien har odlare tagit bort hela odlingar av de mycket känsliga nya sorterna Kanzi och Rubens redan efter några få år av produktion. Även i USA och Nya Zeeland har epidemier orsakat stora problem [1], [2], [3].

Svampen, som orsakar sjukdomen, kan infektera träd under hela året men den kommer alltid in i trädet via sår. Bladärr, beskärningssår, fruktärr, grenbrott och frostsador är viktiga inkörsportar. Grenar och även stammen kan bli omringade av kräftsår, vilket leder till stora skador och ofta innebär att trädet dör. *Neonectria* orsakar också skador på frukt under lagring [4]. Kräftangripna träd av andra växtslag, bl.a. björk och poppel, som växer nära välskötta fruktodlingar, kan också vara en smittokälla [5]. Dessutom kan unga träd bli infekterade redan vid förökning i plantskolorna [6]. Efter en latent period på 3-5 år, kan systemiska infektioner plötsligt bryta ut på träden. Svampen sprids med luftburna sporer och med regnstänk inom samma träd och till närliggande träd.

Resistens mot fruktträdskräfta är en kvantitativ egenskap som påverkas starkt av de fysiologiska förhållandena [7]. Forskning [8], [9], observationer i genbanker [10] och odlarnas erfarenheter (personliga meddelanden) har visat att äpplesorter skiljer sig i antalet infektioner, spridningen av sår och i vilken grad de kan läka ut mindre angrepp. Vissa sorter kan t.o.m. täcka över små sår genom att stöta bort sjuk vävnad och bilda kallusvävnad över sårytan [11].

De flesta sorter, som odlas i Sverige, exempelvis Discovery, Ingrid Marie och James Grieve är känsliga för sjukdomen. Vissa är synnerligen mottagliga, som Cox Orange, Elise, och Rubens. Det finns även flera sorter som är kända för att ha en relativt hög nivå av motståndskraft som Jonathan, Santana, Golden Delicious, Aroma och Filippa. Av dessa, odlas bara Santana och Aroma kommersiellt i Sverige. Fullständig resistens mot fruktträdskräftan har ännu inte dokumenterats i *Malus*.

Graden av resistens påverkas också av miljön: en och samma sort kan uppfattas som relativt motståndskraftig i en miljö och under vissa odlingsförutsättningar, men som relativt mottaglig i en annan [7]. Detta kan givetvis påverka slutsatserna om sorternas resistens/mottaglighet. Sålunda är Aroma relativt motståndskraftig under gynnsamma odlingsbetingelser men angrips kraftigt på vattensjuk mark. Det finns även information och personliga observationer om att val av grundstam påverkar hur en och samma sort tål sjukdomen [12]. De grundstammar som används idag är i sig mottagliga. Dessutom kan de på olika sätt påverka ympens mottaglighet/resistens. Även om ympen inte innehåller någon smitta, kan en smittad grundstam infektera hela trädet. Dessutom kan en frisk men olämpligt vald grundstam försvaga trädet så att det lättare angrips av kräfta. Enligt information från odlare, klarar Elise på den något mera starkväxande grundstammen Mark angrepp av kräfta bättre än då sorten är ympad eller okulerad på den mera svagväxande M9 [12].

När nya sorter tas fram, testas dessa inte rutinmässigt för mottaglighet/resistens mot fruktträdskräfta, till skillnad mot exempelvis skorv. Informationen om kräfteresistens baseras vanligtvis på ett mycket begränsat antal träd som dessutom har odlats på ett begränsat antal platser och för ett fåtal år. Följaktligen kan nya sorter ge ett felaktigt intryck av att vara ganska motståndskraftiga endast för att de ännu inte utsatts för ett allvarligt sjukdomstryck. Ett mycket tydligt exempel är Elise, en av de mest odlade sorterna i Sverige. Denna sort släpptes som relativt kräft-resistent eftersom inga allvarliga infektioner har observerats. Men senare visade Elise sig vara mycket känslig, både i odlingar och i inokuleringstester [8], [9].

Projektets mål har varit att: (1) undersöka genetiska skillnader i mottaglighet för fruktträdskräfta bland äppelsorter, grundstammar och vilda arter och (2) utveckla en PCR-baserad metod för att påvisa angrepp av kräfta i ved av äppleträd. Vi lyckades uppnå alla de uppsatta målen. Slutrapporten presenterar ett axplock av de mest intressanta resultaten.

Material och metoder

Inokuleringstester

Samanlagt 78 sorter (inklusive nummersorter), 4 grundstammar och 3 vilda arter testades för resistens mot *N. ditissima* i flera olika experiment. Inokuleringar utfördes på avklippta kvistar och på ettåriga träd. Inokuleringar på avklippta kvistar utfördes i växthuset på SLU-Balsgård och i biotronen på SLU-Alnarp. Inokuleringar på träd utfördes i växthuset på Alnarp och i fält på Balsgård och Alnarp. Vi utvärderade två resistenskomponenter: 'colonization rate' och 'infection percentage'.

Bedömning av 'colonization rate'

Inokuleringar på avklippta kvistar

Kvistarna klipptes i februari–mars och förvarades i ett kylrum vid +4 °C. Kvistarna togs ut ur kylrummet och placerades i ett växthus (2011) eller i en dagsljus klimatkammare (2012 och 2013) 4 dagar innan inokuleringarna. Alla försök genomfördes i två randomiserade block. Blocken inokulerades den 13/5 och den 25/5 under 2011, den 16/4 och den 14/5 under 2012 och den 11/3 och den 26/3 under 2013. I alla försök inokulerades kvistarna i sår efter bortskurna knoppar med 1000 konidier/sår enligt tidigare beskriven metodik [8]. Två kvistar per sort och block blev inokulerade under 2011 och fyra kvistar per sort och block under 2012 och 2013. Varje kvist hade 3 inokuleringsställen. Inokulerade kvistar placerades i 1-liters

glasburkar med ungefär 300 ml vatten med 5ml/l Chrysal, med två kvistar av olika sorter per burk i alla försök. Burkarna placerades i ett plasttält i växthus (2011) eller i en klimatkammare (2012 och 2013) i slumpmässig ordning. Vi hade också två kontrollkvistar per sort: en inokulerades med vatten och en inokulerades inte alls. För detaljerad beskrivning av experimenten under 2011 och 2012 se lägesrapporterna för respektive år.

Under 2013, var klimatkammaren programmerad för 16 timmar dag med temperaturen 22°C och 4 timmar natt med temperaturen 16°C, luftfuktigheten hålls konstant, 80%.

Vattnet i burkarna byttes ut en gång per vecka och ca 5 mm klipptes av på varje kvist för att förnya snittet. Skadorna lästes av en gång per 5 dagar under 2011 och en gång per vecka under 2012 och 2013 med början ca 10-14 dagar efter inokuleringstillfället.

Inokulering av ettåriga träd

De första inokuleringarna på ettåriga träd utfördes under 2011 (se lägesrapport för detaljer). Inokuleringar utfördes vintern 2011–2012 på träd av 58 sorter förökade på grundstam B9, medan 48 sorter förökade på M9 inokulerades under vintern 2012–2013 och 21 sorter förökade på M9 inokulerades vintern 2013–2014, alla i ett växthus i Alnarp. Två block med 4 träd/sort i varje block infekterades under 2011–2012, tre block med 3 träd per sort under 2012–2013 och fyra block med 3 träd per sort under 2013–2014. Blocken inokulerades 9/11 och 21/11 2011, 7/11, 10/12, och 18/12 2012. och 13/11, 21/11, 27/11 och 5/12 2013. I alla undersökningar utfördes tre inokuleringar per träd med 1000 konidier/sår. Träden inokulerades i knoppsår som i [9]. Skadorna lästes av varannan vecka med början ca 6 veckor (42 dagar) efter inokuleringstillfället (2011), 8 veckor (56 dagar) efter inokuleringstillfället (2012) och 7 veckor (49 dagar) efter inokuleringstillfället (2013), beroende på hur snabbt infektionen utvecklades.

Bedömning av 'infection percentage'

'Infection percentage' bedömdes genom 'naturliga' inokuleringar i bladsår på träd odlade under högt infektionstryck. Fyra träd per sort planterades på fält i Alnarp i november 2011 och 8 träd per sort i november 2012. Bitar av ved med kräftsår hängdes ovanför topparna på ettåriga friska träd och träden duschades under 5 dagar så att de fick nederbörd motsvarande en normal svensk höst och sporererna i hög koncentration hamnade på spontant bildade sår efter avfallna blad. Påföljande vår läste vi av antalet infekterade bladsår jämfört med totala antalet bladsår.

qPCR

Primer design, specificitet och känslighet

Vi framställde ett primerpar från en speciell region i genomet av *N. ditissima*. För att kontrollera att detta primerpar amplifierar DNA endast av just *N. ditissima*, extraherade vi DNA av både *N. ditissima* från kräftsår och från ett antal andra patogena svampar: *Botryosphaeria* sp. (avocado), *Botryosphaeria dothidea* (kiwi), *Botrytis cinerea* (squash), *Colletotrichum acutatum* (äpple), *Colletotrichum gloeosporioides* (äpple), *Cladosporium* sp. (avocado), *Cryptosporiopsis* sp. (kiwi), *Elsinoe pyri* (äpple), *Nigrospora* sp. (avocado), *Penicillium* sp. (avocado), *Pestalotia* sp. (avocado), *Phialophora* sp. (kiwi), *Phlyctema* sp. (kiwi), *Phoma* sp. (avocado), *Phomopsis* sp. (avocado), *Sphaceloma perseae* (avocado), *Stemphylium* sp. (avocado), *Venturia inaequalis* (äpple), *Neofabraea alba* (äpple), *Neofabraea malicorticis* (äpple), *Neofabraea perennans* (äpple), *Neofabraea krawtzevii* (poppel). Allt DNA isolerades med 'genomic DNA purification kit' enligt tillverkarens instruktioner (Fermentas, Maryland, USA). DNA koncentration och renhet verifierades med ND-1000 NanoDrop (Wilmington, USA) och agaros gel-elektrofores (2%). För PCR använde vi 10 ng av renat DNA från de olika svamparterna.

Vi har också testat vårt primerpar för att försäkra oss om att det uppför DNA från olika *N. ditissima* isolat. Vi samlade därför in 25 isolat från olika äpplesorter som representerar en stor geografisk bredd (Tabell 1).

För att se om det är möjligt att upptäcka DNA av *N. ditissima* i ved av äppleträd, tog vi prov från kräftsår orsakade av naturlig infektion i fält på äldre träd av Elise, Aroma, Ingrid Marie, Discovery, Åkerö, Rubinstar och Gloster. Proven togs i mitten av såret och i närliggande områden utanför såret.

Tabell 1. Isolat av *N. ditissima* som användes i denna studie. Om ingen annan lokal anges, isolerades svampen från äppleträd som växer i genbanken på SLU-Balsgård.

	Äppelsorten som svampen isolerades ifrån		Äppelsorten som svampen isolerades ifrån
<i>Isolat 1</i>	Aroma	<i>Isolat 14</i>	Tompkins King
<i>Isolat 2</i>	Ingrid Marie (Jonstorp)	<i>Isolat 15</i>	Classic Red Delicious
<i>Isolat 3</i>	Rubinstar	<i>Isolat 16</i>	Beacon
<i>Isolat 4</i>	Åkerö	<i>Isolat 17</i>	Holsteiner Cox
<i>Isolat 5</i>	Norrstack	<i>Isolat 18</i>	Freiherr von Berlepsch
<i>Isolat 6</i>	Oranie	<i>Isolat 19</i>	Gravensteiner
<i>Isolat 7</i>	James Grieve	<i>Isolat 20</i>	Gloster
<i>Isolat 8</i>	Discovery (Kivik)	<i>Isolat 21</i>	Ingrid Marie
<i>Isolat 9</i>	Ingrid Marie (Kivik)	<i>Isolat 22</i>	Elise
<i>Isolat 10</i>	John Standish	<i>Isolat 23</i>	Discovery (Belgium)
<i>Isolat 11</i>	Brite Spur	<i>Isolat 24</i>	Api Etoile
<i>Isolat 12</i>	Pigeon	<i>Isolat 25</i>	Red Baron
<i>Isolat 13</i>	McIntosh		

Amplifiering av DNA med PCR

DNA från *N. ditissima* amplifierades med vårt primerpar i 25 µl av reaktionsblandningen. Reaktionsblandningen innehöll 2.5 µl av 10X PCR buffert, 0.2 mM dNTP blandning, 0.5 µM av varje primer, 1.5 mM av MgCl₂, 1 enhet av *Taq* DNA polymeras och 10 ng av genomiskt DNA. PCR utfördes i en 'thermal cycler' med följande program: ett inledande steg av denaturering under 5 min vid 95 °C, följt av upp till 35 cykler av denaturering under 15 s vid 95 °C, 'annealing' av primerpar under 30 s vid 60 °C, förlängning av DNA-kedjan under 15 s vid 72 °C och ett slutligt förlängningssteg under 5 min vid 72 °C.

'Quantitative PCR' (qPCR) analys. Mängd av svampbiomassa från *N. ditissima* bestämdes med hjälp av qPCR analys. För qPCR inokulerade vi sex ettåriga äppleträd av sorterna 'Elise', 'Cox Orange', 'Aroma', 'Santana', 'Discovery' och 'Golden Delicious', som odlades i krukor, tre träd per sort. Tre axillära knoppar, nummer 11, 14 och 17 räknat från trädtoppen, togs bort med en skalpell och de resulterade såren inokulerades med svampkonidier. Vi tog de första proverna i ett tidigt stadium av infektionen, när inga symtom kunde ses. När infektionssymtomen blev synliga, tog vi prov från den mittersta delen av kräftsåret. Samtidigt tog vi prov från trädens rötter för att undersöka om smittan sprids snabbt också till rötterna. Genomiskt DNA isolerades från infekterat växtmaterial med användning av 'Fermentas Genomic DNA Purification Kit' (Fermentas, Maryland, USA) enligt tillverkarens instruktioner. qPCR amplifieringar utfördes med användning av 'CXF69 Real-Time PCR system' (BioRad Laboratories, Hercules, USA) med följande program: 3 minuter vid 95 °C, följt av 40 cykler om 5 s vid 98 °C och 5 s vid 60 °C. Reaktionsblandningen (20 mikroliter för varje reaktion) bestod av 1 × SsoFast EvaGreen qRT-PCR SuperMix (BIO-RAD, USA), 0.3 µM 'forward' och 'reverse' primer och 3 µl DNA. För att bekräfta specificiteten av PCR-produkten analyserade vi smältkurvan.

Statistiska analyser

Utbredningen av kräftsadorna mättes med ett digitalt skjutmått och noterades i en excel-ark. Medelvärde beräknades för varje sort och varje behandling för vart och ett av de 5 avläsningstillfällena för kvistinokuleringarna och för vart och ett av de 7 avläsningstillfällena för trädinokuleringarna. På detta sätt fick vi en linje, som beskriver sjukdomsförloppet (se Figur 1). För att fastställa skillnader i mottaglighet för *N. ditissima* för de analyserade

äpplesorterna, beräknades arean under linjen av sjukdomsförloppet (Area under the curve, AUC) och användes i en variansanalys med t-test (LSD) för AUC och $p \leq 0.05$ signifikans. Beräkningarna utfördes med det statistiska programpaketet SAS. Samband mellan resultat framtagna med olika metoder och under olika år beräknades med ett annat program, Minitab, för medelvärden för AUC, som vi fick som 'output' vid variansanalysen.

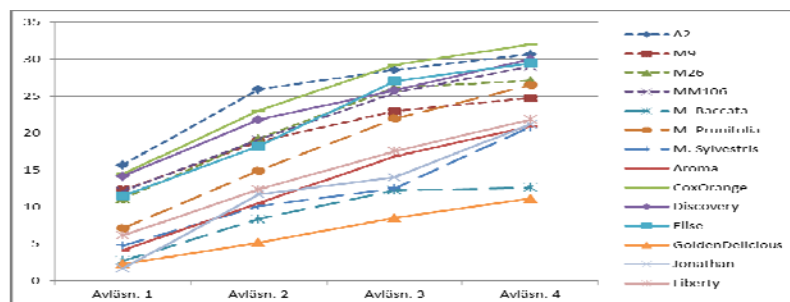
'Infection percentage' beräknades som andelen infekterade bladsår jämfört med det totala antalet bladsår.

Resultat

Resultat från kvistinokuleringarna från 2011 och 2012 (39 sorter vardera året) presenterades i de respektive lägesrapporterna. Här presenterar vi resultaten för 47 sorter analyserade 2013 (Tabell 3). De mest mottagliga sorterna var Cox Orange, Fiesta och Linda och de minst mottagliga var Golden Delicious, Hibernall och Prairiefire. Det måste dock påpekas att Hibernall hade många oinfekterade sår, vilket kan vara ett tecken på resistens men det kan också bero på misslyckade inokuleringar. Under 2013 testade vi dessutom 4 grundstammar och 3 vilda arter. Resultat för mottaglighet/resistens hos de analyserade grundstammarna och vilda arterna i jämförelse med mottaglighet/resistens hos sorterna presenteras i Figur 1. Grundstammarna A2 och MM106 visade sig i princip vara lika mottagliga som två kända mottagliga sorter, Cox Orange och Elise; M26, M9 och *M. prunifolia* ligger mellan Elise (mottaglig) och Liberty (måttligt mottaglig); *M. baccata* och *M. sylvestris* placerade sig mellan Liberty (måttligt mottaglig) och Golden Delicious (relativt resistent), dock var *M. baccata* närmare Golden Delicious även i slutet av försöket.

Tabell 3. Skillnader i graden av resistens mot *N. ditissima* för 47 äpplesorter baserade på inokulering av avklippta kvistar i biotron under våren 2013. Olika bokstäver under 'Grupp' indikerar signifikanta skillnader.

Namn	N	AUC	Grupp	Namn	N	AUC	Grupp
Cox Orange	4	618.62	A	Hornö	8	391.07	ABCDEF
Fiesta	8	600.53	AB	Hampus	8	376.78	ABCDEF
Linda	8	581.56	ABC	Risäter	7	373.02	ABCDEF
Opalescence	7	553.93	ABCD	Mutsu	8	368.46	ABCDEF
Geneva Early	7	541.90	ABCD	USA:NY 55-140-9	8	361.47	ABCDEF
Julyred	6	537.01	ABCD	Pirja	8	359.94	ABCDEF
Heta	8	505.03	ABCD	Spencer	8	354.39	ABCDEF
Nanna	8	496.59	ABCDE	Juuso	7	352.91	ABCDEF
Discovery	6	493.15	ABCDE	Saltanat	8	352.17	ABCDEF
Gult Kaneläpple	8	478.28	ABCDE	Liberty	8	342.62	BCDEF
Snövit	8	460.47	ABCDE	Gala	6	338.97	BCDEF
Ölands Kungsäpple	7	459.59	ABCDE	Cortland	8	328.47	CDEF
Eir	8	457.06	ABCDE	Maigold	5	321.49	CDEF
Bramley	8	455.02	ABCDE	Astrakan Röd	8	319.18	CDEF
BM44044	8	445.64	ABCDE	Angold	4	311.19	DEF
Jonagold	5	444.79	ABCDE	Criterion	6	310.05	DEF
Prima	5	436.12	ABCDE	Aroma	8	281.49	EFG
Katja	7	413.80	ABCDEF	John-Georg	8	280.66	EFG
Apelsinöe	7	411.91	ABCDEF	Jonathan	5	275.62	EFG
Elise	7	400.93	ABCDEF	Spässerud	6	273.22	EFG
Konsta	8	400.88	ABCDEF	Golden Delicious	7	158.36	FG
Himmelstalund	5	396.34	ABCDEF	Hibernall	5	92.26	GH
Santana	8	396.04	ABCDEF	Prairiefire	7	87.82	H
Charlamovsky	6	395.66	ABCDEF				



Figur 1. Utveckling av skador på avklippta kvistar av sorter, grundstammar och vilda arter av äpple. Försöket genomfördes i biotron under 2013.

Trädinokuleringar

På ettåriga träd testade vi inokuleringar vid olika tider på året: vårinokuleringar i fält (våren 2011), vårinokuleringar i växthuset (våren 2012), och höstinokuleringar (2011–2012, 2012–2013, 2013–2014). Under 2011–2012 kom vi fram till att resultaten från höstinokuleringar i växthus var de mest informativa och därför fortsatte vi med bara höstinokuleringar under 2012–2013 och 2013–2014. Resultat av inokuleringarna 2011–2012 presenterades i lägesrapporten för 2012. Här presenterar vi resultaten för 2012–2013 (Tabell 4) och för 2013–2014 (Tabell 5). För de flesta kända sorterna stämde våra resultat överens med information om sorternas resistens som vi fick av odlare, plantskolister och från litteraturen.

Tabell 4. Skillnader i graden av resistens mot *N. ditissima* för 48 äpplesorter baserade på höstinokulering av ettåriga träd (2012–2013). Olika bokstäver under 'Grupp' indikerar signifikanta skillnader.

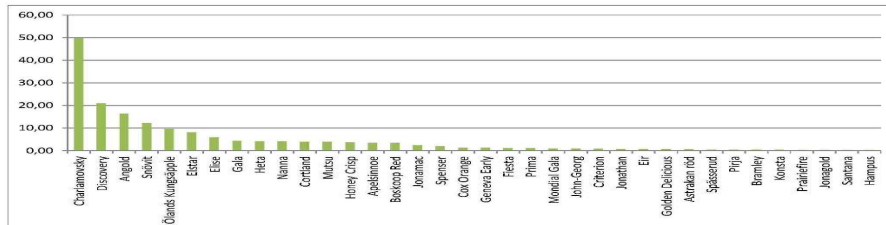
Namn	N	AUC	Grupp	Namn	N	AUC	Grupp
Eir	9	3179.2	A	Pirja	8	1988.2	GHIJKLMNO
Boskoop Röd	8	2937.6	AB	Apelsinöe	9	1912.2	HIJKLMNOP
Cortland	8	2882.3	AB	Gult Kaneläpple	9	1909.0	HIJKLMNOP
Braeburn	9	2801.7	ABC	Jonathan	9	1884.2	IJKLMNPPQ
Jonamac	9	2651.8	ABCD	Criterion	8	1871.3	IJKLMNPPQ
Charlamovsky	9	2641.8	ABCD	Linda	9	1842.2	IJKLMNPPQR
Mondial Gala	9	2638.0	BCD	Spencer	9	1814.1	IJKLMNPPQR
Jonagold	9	2586.8	BCDE	Aroma	9	1811.0	IJKLMNPPQR
Hampus	9	2527.5	BCDEF	Konsta	9	1777.8	JKLMNPPQR
Gala	9	2518.9	BCDEFG	Amorosa	9	1738.2	KLMNPPQRS
Opalescence	9	2511.1	BCDEFG	Liberty	9	1728.7	LMNPPQRS
Fuji	9	2480.0	BCDEFG	Ölands Kungsäpple	9	1705.3	LMNPPQRS
Elise	9	2451.2	BCDEFG	Röd Astrakan	9	1702.7	LMNPPQRS
Fiesta	9	2443.5	BCDEFGH	Saltanat	9	1680.0	MNPPQRS
Cox Orange	9	2432.3	BCDEFGH	Maigold	9	1636.5	MNPPQRS
Spässerud	9	2333.6	CDEFGHI	John-Georg	8	1535.4	MNPPQRS
Elstar	9	2306.1	CDEFGHIJ	USA:NY99155-9	9	1486.2	NPPQRS
Prima	9	2288.7	CDEFGHIJ	Mutsu	9	1455.5	PPQRS
Heta	9	2267.8	CDEFGHIJK	Granny Smith	9	1427.5	PPQRS
Honeycrisp	9	2232.5	DEFGHIJKL	Bramley	9	1420.8	PPQRS
Angold	9	2070.4	EFGHIJKLM	Snövit	9	1400.1	PPQRS
Nanna	8	2024.3	FGHIJKLMN	Golden Delicious	9	1346.9	PPRS
Geneva Early	9	2022.5	FGHIJKLMN	Santana	9	1327.7	PPRS
Discovery	8	1991.6	FGHIJKLMNO	Prairiefire	9	1210.2	S

Tabell 5. Skillnader i graden av resistens mot *N. ditissima* för 21 äpplesorter baserade på höstinokulering av ettåriga träd (2013–2014). Olika bokstäver under 'Grupp' indikerar signifikanta skillnader.

Namn	N	AUC	Grupp	Namn	N	AUC	Grupp
Charlamovsky	12	3504.8	A	Liberty	12	2259.2	FG
Gala	12	3374.6	AB	Mutsu	12	2222.9	FGH
Discovery	12	3170.9	ABC	Maigold	12	2172.7	FGH
Juuso	12	3033.3	BC	Jonathan	12	2167.4	FGH
Cox Orange	12	3009.6	BC	Snövit	12	2100.8	GH
Elise	12	2853.7	CD	Gult Kaneläpple	12	2047.4	GH
Risäter	12	2825.8	CD	Santana	12	2040.0	GH
Prima	12	2763.8	CDE	Aroma	11	1792.2	HI
Hornö	12	2557.7	DEF	Astrakan Röd	12	1786.0	HI
Hibernal	12	2440.6	DEFG	Golden Delicious	12	1443.9	I
Himmelstalund	12	2358.7	EFG				

'Infection percentage'

Vid bedömning av 'Infection percentage', hade Charlamovsky, Discovery, Angold och Snövit mer än 10% av alla bladsår infekterade och Ölands Kungsäpple, Elstar och Elise hade mer än 5% (Figur 2). För de andra sorterna var resultaten inte lika informativa. Vi anser dock att information om 'infection percentage' är mycket viktig och därför upprepades försöket med 21 sorter under 2013–2014 varvid träden duschades i 10 dagar i stället för 5. Dock ska försöket läsas av i juni 2014 (utanför ramen för detta projekt).



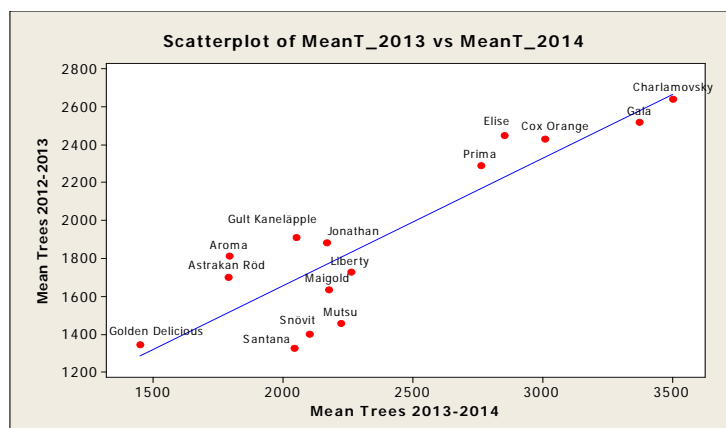
Figur 2. 'Infection percentage' hos ettåriga träd.

Samstämmighet mellan kvist- och trädinokuleringar

För att undersöka graden av samstämmighet mellan resultat framtagna med olika inokuleringsmetoder samt reproducerbarhet av resultat från olika år, beräknade vi korrelationsanalyser för 15 sorter (Aroma, Astrakan Röd, Charlamovsky, Cox Orange, Elise, Gala, Golden Delicious, Gult Kaneläpple, Jonathan, Liberty, Maigold, Mutsu, Prima, Santana, Snövit) som alla ingick i fyra olika experiment: inokulering av kvistar i biotron under 2012 och 2013 och inokulering av träd i växthuset under 2012–2013 och 2013–2014. Korrelationsvärdena var höga eller medelhöga och i de flesta fall signifikanta. Resultat av både trädinokuleringar (Figur 3) och kvistinokuleringar stämde bra överens mellan åren. Dock var korrelationerna mellan kvistinokuleringar från 2013 och de båda trädinokuleringarna inte signifikanta (Tabell 6).

Tabell 6. Korrelationer mellan olika metoder att undersöka olika äppelsorters mottaglighet samt för analyser utförda under olika år. Korrelationerna beräknades på medelvärden av AUC för varje sort.

	Kvistar, 2012	Kvistar, 2013	Träd, 2012–2013
Kvistar, 2013	0,700; p=0,004	-	
Träd, 2012–2013	0,599; p=0,018	0,401; p=0,138	
Träd, 2013–2014	0,536; p=0,039	0,495; p=0,061	0,881; p=0,000



Figur 3. Korrelation mellan resultat av inokuleringar av ettåriga träd för 15 sorter (0.881; P=0.000)

Detektion av svampen

Vårt primerpar amplifierade en artspecifik PCR-produkt med en förväntad storlek på 150–200 bp från DNA framställt från *N. ditissima* medan DNA av andra patogena och entofhyta svampar (se Material och metoder) inte producerade några band (Figur 4). Dessutom amplifierade vårt primerpar samma PCR-produkt från DNA av *N. ditissima* ur olika isolat (sammanlagt 25 st, se Material och Metoder) (Figur 5). Med hjälp av qPCR analys kunde vi påvisa DNA från *N. ditissima* i prov som togs i mitten av kräftsår hos alla äppelsorter, både i de prov som togs i fält och i de prov som togs på ettåriga träd i växthus. Dock kunde vi inte påvisa svamp-DNA i vävnader utanför kräftsåren, troligen på grund av att mängden DNA inte var tillräckligt hög i dessa vävnader. Vi kunde heller inte hitta något svamp-DNA i rötterna på de infekterade träden eller i prov som togs från friska vävnader. Vid jämförelse av mängden detekterat DNA av *N. ditissima* från kräftsår hos sex sorter med olika mottaglighet, visade det sig att den känsliga 'Elise' hade högre värden än de andra sorterna.



Figur 4. Specificitet av primerpar: specifikt band syns bara för *Neovectria ditissima*

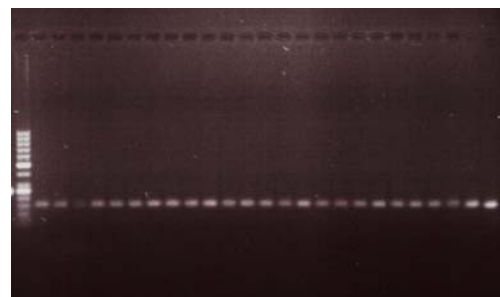


Fig. 2. PCR-produkt med *Neovectria*-specifikt primerpar, som användes på olika isolat av *N. ditissima*

Diskussion

Resistens mot fruktträdskräfta är en kvantitativt nedärvd egenskap, som även påverkas av olika odlingsfaktorer. I våra tester kunde vi observera stor variation i sårstorlek mellan inokuleringsställen och mellan träd av samma sort. Under projektets lopp ökade vi antal inokulerade kvistar per sort från 4 (2011) till 8 (2012 och 2013). Under inokuleringarna dör kvistarna ibland av andra orsaker är själva sjukdomen, och i många fall kunde vi bara använda 5 eller t.o.m. 4 av de 8 kvistarna för våra statistiska beräkningar.

Även för höstinokuleringarna på ettåriga träd ökade vi antal inokulerade träd per sort från 8 (2011–2012) till 9 (2012–2013) och vidare till 12 (2013–2014). Baserad på vår erfarenhet, är det nödvändigt att testa åtminstone 8–10 träd per genotyp för att få pålitliga och reproducerbara resultat. Dessutom måste man utföra olika inokuleringstester och helst under åtminstone 2 år för att få en korrekt uppskattning av sorternas (genotypernas) resistens. Tillgång till kompletterande metoder, som bedömning av mängd av svampbiomassa i de infekterade vävnaderna kan ge ännu bättre insyn i sorternas resistens.

Kvistinokuleringar ger snabbt resultat, men är mindre reproducerbara än inokuleringar av ettåriga träd. Detta bekräftas också av analyserna av hur väl resultat framtagna med olika metoder och under olika år överensstämmer, med högst värden för trädinokuleringar under 2012–2013 och 2013–2014. I båda dessa försök var träden förökade på M9. Under 2011–2012 var träden förökade på B9 eftersom vi inte lyckades få tag i tillräckligt antal av M9. Resultat från 2011–2012 presenterades i lägesrapporten för 2012: 9 sorter var gemensamma för 2011–2012, 2012–2013 och 2013–2014. Dock hade inte jämförelserna samma styrka som de resultat vi presenterar här, beroende på att antalet sorter var mycket mindre och på att träden stod på olika grundstam. Bedömning av två olika resistensparametrar, 'colonization rate' och 'infection percentage', är nödvändigt för att man ska kunna göra en välgrundad bedömning av

resistensnivåerna för olika sorter. Båda faktorerna, dvs hur lätt svampen kan infektera en viss sort genom bladsår och hur snabbt den kan spridas och döda vävnader när den har lyckats etablera sig i trädet, är mycket viktiga.

Vissa sorter, som Golden Delicious, Aroma och Santana, visade låga till medelhöga värden för 'colonization rate' i både kvist- och trädinokuleringarna samt i 'infection percentage', medan andra sorter, som Snövit, visade relativt låga värden i trädinokuleringarna men jämförelsevis höga i kvistinokuleringarna och vid bedömning av 'infection percentage'.

För att en sort (genotyp) ska bedömas som relativt resistent, måste den visa stabilt låga värden för de olika resistensparametrarna under åtminstone två, helst tre år.

Andra, kompletterande metoder för att bedöma resistens behöver utvecklas och valideras, liksom även olika metoder för databearbetning. Den PCR-baserade detektionsmetoden fungerar väl för att påvisa kräftinfektion (vårt primerpar används även i Nya Zeeland för att kartlägga smittospridning). Mer arbete behövs dock för att kunna tillämpa denna metod för att detektera latent smitta.

Slutsatser och rekommendationer till näringen

Vi har visat användbarheten av de befintliga metoderna för att undersöka resistens mot fruktträdskräftan i äpple, och har hittat flera sorter med relativt hög resistens som kan användas (och redan används) i odling. Vi har också hittat flera sorter, som är mycket mottagliga och därmed kräver förebyggande åtgärder och noggrann fälthygien. Vi har också belyst behovet av att föra forskningen på fruktträdskräfta vidare. För att minska problemen i odlingarna, behövs det mer kunskap om orsakerna till de sortskillnader som vi har belagt. Likaså behövs mera kunskap om påverkan av grundstam och odlingsbetingelser på sorternas resistens. Det behövs mera kunskap om själva svampen, *Neonectria ditissima*, samt kunskap om den genetiska bakgrunden till resistensen. Utveckling av bra molekylära markörer som kan användas i markör-baserad växtförädling bör prioriteras.

Vi framför vår uppskattning till SLF, som har finansierat detta projekt inom ett forskningsområde där behovet av ny kunskap är påfallande, antalet aktiva forskare litet, och där utvecklingspotentialen är mycket stor.

Publikationer

Garkava-Gustavsson L., Zborowska A., Sehic J., Rur M., Nybom H., Lateur M., van de Weg E., Holefors A. (2013) Screening of apple cultivars for resistance to European canker, *Neonectria ditissima*. *Acta Horticulturae* 976: 529-536

Garkava-Gustavsson L., Swiergiel W., Persson Hovmalm H. (2012) Frukträdskräfta: en utmaning för både äppelträd och forskare. *Pomologen* 4.

Ghasemkhani M., Sehic J., Ahmadi-Afzadi M., Nybom H. and L. Garkava-Gustavsson. 2012. Screening for Partial Resistance to Fruit Tree Canker in Apple Cultivars. *Acta Horticulturae*. Submitted.

Garkava-Gustavsson L., Ghasemkhani M., Zborowska A., Englund J.-E., Lateur M., van de Weg E. Evaluation of apple cultivars for resistance to European Canker, *Neonectria ditissima* (manuskript)

Ghasemkhani M, Zborowska A, Scheper R, Everett K., Rur M., Holefors A., Garkava-Gustavsson L. A newly developed real-time quantitative PCR assay to detect and quantify the fruit tree canker caused by *Neonectria ditissima* (manuskript)

Konferensbidrag

Ghasemkhani M., Sehic J., Ahmadi-Afzadi M., Nybom H., Garkava-Gustavsson L.

'Screening for partial resistance to Fruit tree canker in apple cultivars'. Presenterades som

- poster på 2nd Symposium on Horticulture in Europe (SHE 2012), den 1-5 Juli i Angers, Frankrike.
- Garkava-Gustavsson L., Zborowska A., Ghasemkhani M., Sehic J., Nybom H., Englund J.-E., Lateur M., van de Weg E. 'Towards unravelling the genetics of resistance to European canker in apple. Current stage: phenotyping'. Presenterades som poster på RGC6, 30 september – 4 Oktober 2012 i Mezzocorona, Italien.
- Ghasemkhani M., Marttila S., Garkava-Gustavsson L. and H. Nybom. Anatomical studies of woody tissue to investigate fruit tree canker development in apple. Presenterades som poster på International Conference on Plant Genetics and Breeding Technologies, Februari 18-20, 2013, Vienna, Austria.
- Ghasemkhani M., Sehic J., Nybom H. and L. Garkava-Gustavsson. Response of apple cut shoots to infection caused by fruit tree canker; *Nectria ditissima*. Presenterades som poster på 10th International congress of plant pathology. August 25-30, 2013. Beijing, China.
- Garkava-Gustavsson L, Ghasemkhani M, Zborowska A, Sehic J, Nybom H, Englund J-E, ateur M, van de Weg E. 2014. 'Approaches for evaluation of resistance to European Canker (*Neonectria ditissima*) in Apple'. Kommer att presenteras som en muntlig presentation på XXIX IHC i Brisbane, Australien, 17-22 Augusti, 2014.
- Ghasemkhani M, Holfors A, Zborowska A, Scheper R, Everett K, Nybom H, Garkava-Gustavsson L. 'Development of a qPCR detection procedure of fruit tree canker caused by *Neonectria ditissima*'. Kommer att presenteras som en poster på 29-e IHC i Brisbane, Australien, 17-22 Augusti, 2014.

Referenser

1. Jones A.L., Aldwinckle H.S. 1990. *Compendium of Apple and Pear Diseases*. Am. Phytopath. Soc. Press, St Paul, MN.
2. Scheper R. W. A., Fisher B. M. 2010. Comparing methods to determine European canker resistance in apple tree accessions. New Zealand Plant Protection Society (Inc.) www.nzpps.org Refer to http://www.nzpps.org/terms_of_use.html
3. Scheper R.W.A., Fisher B. M., Wood P.N. 2010. Pathogenicity of field and laboratory-grown inoculum of *Neonectria galligena* on potted apple trees. New Zealand Plant Protection Society (Inc.) www.nzpps.org Refer to http://www.nzpps.org/terms_of_use.html
4. Brown A.E., Muthumeenakshi S., Swinburne T.R., Li R. 1994. Detection of the source of infection of apple trees by *Cylindrocarpon heteronema* using DNA polymorphism. *Plant Pathol.* 43: 338–343.
5. Plante F., Hamelin R.C., Bernier L.A. 2002. A comparative study of genetic diversity of populations of *Nectria galligena* and *N. coccinea* var. *faginata* in North America. *Mycol. Res.* 106: 183–193.
6. McCracken A.R., Berrie, A., Barbara D.J., Locke T., Cooke L.R., Phelps K., Swinburne T.R., Brown A.E., Ellerker B., Langrell S.R.H. 2003. Relative significance of nursery infections and orchard inoculum in the development and spread of apple canker (*Nectria galligena*) in young orchards. *Plant Pathol.* 52: 553–566.
7. Lateur M. 2001. Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, pp. 245
8. Van de Weg WE. 1989a. Screening for resistance to *Nectria galligena* Bres. in cut shoots of apple. *Euphytica* 42: 233–240.
9. Garkava-Gustavsson L., Zborowska A., Sehic J., Rur M., Nybom H., Lateur M., van de Weg E., Holfors A. (2013) Screening of apple cultivars for resistance to European canker, *Neonectria ditissima*. *Acta Horticulturae* 976: 529-536.
10. Lateur M., Populer C. 1994. Screening fruit tree genetic resources in Belgium for disease resistance and other desirable characters. *Euphytica*: 77: 147-153.
11. Van de Weg WE. 1989b. Breeding for resistance to *Nectria galligena*; differences in resistance between seedling populations. *Integr. control of pome fruit diseases, vol.II, IOBC Bull. XII/6: 137-145.*
12. Swiergiel W., Svedelius G., Rämert B. 2010. Frukträdskräfta (*Nectria galligena* Bres.) LTJ-fakultetens faktablad 2010:2.