

Slutrapport, SLF H0833534, Phytophthora-angrepp i ärt - en ny allvarlig rotsjukdom i Sverige

Inledning och bakgrund

Rotröta orsakad av algsvampen *Aphanomyces euteiches* (Drechs.) är både globalt och i Sverige en viktig sjukdom som drabbar ärt. Vid Findus AB i Bjuv har man sedan 1960-talet strävat efter att minimera skadeverkningarna av ärtrotträta, framförallt genom att testodla alla kontraktodlares jordar i växthus för att undvika smittade fält. Det här forskningsprojektet initierades efter att man under senare år i dessa biotester och i fält noterat förekomsten av rotröta orsakad av en annan algsvamp som tillhör släktet *Phytophthora*. Ett isolat från Findus odlingsområde bestämdes med traditionella metoder av experter i Holland (Centralbureau Voor Schimmelculture) till *Phytophthora erythroseptica* var *pisi*, en dåligt känd varietet endast omnämnd i en publikation från 1950-talet. Inledande studier på Institutionen för Skoglig Mykologi och Växtpatologi på SLU i Uppsala genomförda med molekylär metodik indikerade dock att det inte var den art som CBS kom fram till, utan antingen var en variant av *Phytophthora sojae*, som är en globalt mycket viktig jordburen patogen på sojabönor, eller en för vetenskapen ännu obeskriven art som står nära *P. sojae*.

I projektet ville vi ha en bred ansats för att orientera oss om olika grundläggande aspekter. Målsättningen med projektet var att kartlägga vilka av våra viktiga kulturväxter som var värdar för patogenen och kunde uppföröka smittan, för att förbättra rådgivningen om lämplig växtföljd. Vi ville också få en uppfattning om storleksordningen på möjliga skördeförloster i fält. Vidare ville vi genomföra en orienterande undersökning om resistens mot *Phytophthora*-rotröta fanns i genpoolen för några viktiga kulturväxter. Viktigt i detta sammanhang var också att med hjälp av molekylära verktyg mer exakt klargöra vilken art det var frågan om.

Material och metoder; genomfört arbete

Patogenitetstester, värdväxtkrets

Sammanlagt testades 48 värdväxtarter för mottaglighet mot isolat 97603, som var det enda som då fanns tillgängligt. Då inledande resultat visade att endast vissa ärtväxter var mottagliga, fortsatte arbetet med att testa ett så brett urval av ärtväxtarter som möjligt, detta möjliggjordes bl.a genom samarbete med de botaniska trädgårdarna i Uppsala och Stockholm som tillhandahöll fröer av vilda arter. Under 2011 testades även ett urval av arter med tre olika isolat.

Fältförsök med olika förfrukter

Tre fält med konstaterad *Phytophthora*-smitta valdes ut för fältförsök som förlängdes under projektets gång till att omfatta fyra år. Under år ett odlades åkerböna på hela ytan för att uppföröka smittan. Under år två och tre odlades olika förfrukter i randomiserade blockförsök för att undersöka en eventuell differentierad effekt på den vidare uppförökningen av smittan, och för att klargöra om mottaglighet i växthusförsök också återspeglades under fältförhållanden. Varje parcell med respektive förfrukt var 60 m² och upprepades fyra gånger

per plats. De olika förfrukterna som odlades under år två och tre utgjordes av tre mottagliga (ärt, åkerböna, fodervicker) och två resistent (rödklöver och blå lupin) baljväxtgrödor. Grönmassan vägdes vid samma tidpunkt i alla parceller för varje förfrukt. Inför år fyra delades parcellerna och det odlades åkerbönor respektive konservärter det fjärde året tvärs över alla parceller och upprepningar vilket gav data för både ärt och åkerböna. Sjukdomsangrepp på rötterna av dessa båda grödor lästes av och skörden mättes.

Isolatinsamling och inventering

En metod för isolering av arten var under utarbetning då projektet startade. Proceduren kräver relativt nyinfekterade rötter, och var därmed arbetskrävande. För att ha ett representativt urval för fortsatta analyser upprättades en samling av totalt 13 isolat, där varje isolat härstammade från ett unikt fält. Isoleringarna utgick från rötter från jordtesterna som utförs vintertid på Findus AB.

Eftersom samtliga biotester för ärtrottröta på Findus AB diagnostiseras med mikroskopi, kunde statistik upprättas för frekvens och geografisk förekomst av *Phytophthoratrotröta*, eftersom patogenen kan skiljas från *A. euteiches* baserat på morfologi.

Molekylär analys och artbeskrivning

För att fastställa att vi hade att göra med en ny art krävdes sekvensdata (en nukleär och en mitokondriell gen) från flera isolat, och ytterligare sekvensdata (flera nukleära gener) för ett isolat. PCR amplikoner från de 13 isolaten togs fram i Uppsala, och skickades på sekvensering i Korea. Den fylogenetiska analysen av sekvensdatat upprättades i samarbete med Dr Jaime Blair (Franklin & Marshall College, PA, USA) som utförde de formella analyserna med hjälp av tidigare publicerade data från andra arter.

Den formella beskrivningen av en ny art är en viktig process för att underlätta publiceringen av den fortsatta forskningen. Till det krävs förutom patogenitetstester, typkulturer och molekylära data också morfologiska och fysiologiska analyser och statistisk bearbetning av dessa. Dessa experiment utfördes i Uppsala och den taxonomiska artbeskrivningen där patogenen fick namnet *Phytophthora pisi* inkluderades i en uppsats om patogenen och sjukdomen som publicerades i Plant Disease.

Baserat på ITS sekvensdata designades också arts specifika PCR primers som kan utvärderas och förhoppningsvis användas för detektion och kvantifiering av patogenen i jord och växtmaterial. Vi har inte gått vidare med den delen ännu, men under projektets gång har en samling med jordprover från Findus biotester sparats, varav en del har bekräftad naturlig smitta av *Phytophthora pisi*. Dessa blir värdefulla för att utvärdera molekylära detektionsmetoder i jord i framtiden.

Resistensscreening

Screening av genetiskt material av ärt för resistens mot *Phytophthora pisi* utfördes på Findus AB. Denna del av projektet delfinansierades av KSLA. Efter inledande försök stod det klart att stark resistens i ärt inte var lätt att hitta, vi utökade därför ansatsen till att titta på genbanksmaterial också från tre av de andra kulturväxterna som befunnits mottagliga, nämligen åkerböna, lins och kikärt. Totalt screenades ett hundratal linjer av dessa arter, och

176 ärtlinjer.

Artificiell jordinokulering och analys av sjukdomshämning

På ett tidigt stadium i projektet visade det sig att det är svårt att producera stora mängder vilsporer av *P. pisi* i flytkultur på det sätt som fungerat väl för att producera ett doserbart pulverformat inokulum av *A. euteiches*. Efter vissa optimeringsansträngningar fick vi fram en liten mängd sådant inokulum som testades under 2012 och som i klimatkamarförsök kunde orsaka tydliga symptom i naturlig jord. Det har däremot inte under projektets gång varit möjligt att enligt projektplanen testa artificiellt inokulerade jordar för sjukdomshämning och effekter av kalciumtillsatser.

Resultat

Patogenitetstester, värdväxtkrets

Huvuddelen av arbetet med patogenitetstester för att kartlägga värdväxtkretsen utfördes under 2009. Alla arter som klassades som mottagliga står fylogenetiskt nära ärt i ärtväxternas familjetråd. De inkluderar förutom ärt, kulturväxterna åkerböna, lins, kikärt och fodervicker, och ett antal vildväxande arter i släktena *Lathyrus* och *Vicia*. Andra agronomiskt viktiga baljväxter som lusern, lupin, käringtand, klöverarter, vanlig böna m.fl var resistenta mot angrepp. Den senare omgången patogenitetstester som utfördes med tre olika isolat bekräftade resultaten från den första. Resultaten finns publicerade i Plant Disease.

Förfrukter och grönmassa i fältförsök

De första försöksåren visade att det förutom *Phytophthora* även fanns *Aphanomyces euteiches* på alla försöksplatser. Under de tre första försöksåren vägdes grönmassan och resultaten tyder på att både *A. euteiches* och *P. pisi* angrep framförallt ärt. Sjukdomsindex var högt och färskvikten var låg. Det gick att hitta oosporer av både *A. euteiches* och *P. pisi* i ärtrotterna. I åkerbönona fanns det oosporer av *P. pisi* och i fodervicker fanns det oosporer av både *A. euteiches* och *P. pisi*. Ingen av patogenerna hittades i rödklöver eller blå lupin.

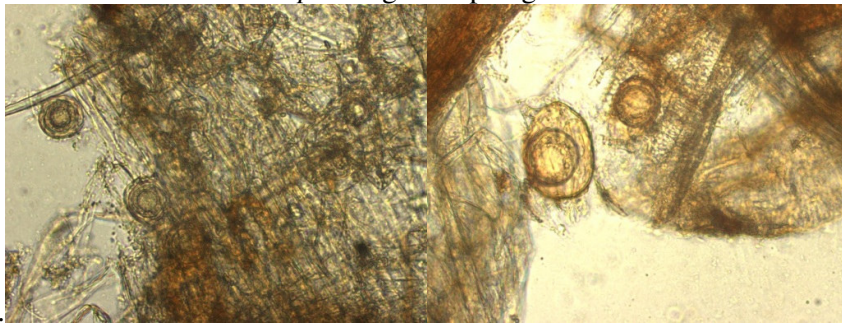


Fig. 1. Oosporer av *Aphanomyces euteiches* (t.v.) och *Phytophthora pisi* (t.h.) i rötter av fodervicker från fältförsöket i Kärrarp 2010. Foto: Anna-Kerstin Arvidsson.

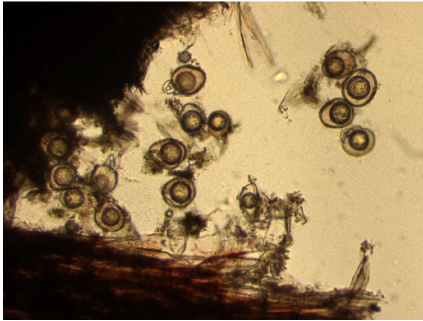


Fig. 2. *Phytophthora pisi* i rötter av åkerbönor i naturligt infekterad fältjord.
Foto: Anna-Kerstin Arvidsson.

Effekt på sjukdomsindex och skörd av åkerböna och ärt

Sjukdomsindex och skörd för åkerböna och ärt under år fyra analyserades statistiskt med variansanalys och med försöksplatsen som block. Medelvärdet för sjukdomsindex på åkerbönor för de tre försöksplatserna var signifikant högre ($P \leq 0,05$) efter åkerbönor än efter övriga grödor (fig. 3). Skörden för åkerbönor var på motsvarande sätt signifikant lägre efter åkerbönor och ärt jämfört med rödklöver och blå lupin (fig. 4). Även efter fodervicker fanns det en tendens till lägre skörd i åkerbönonorna.

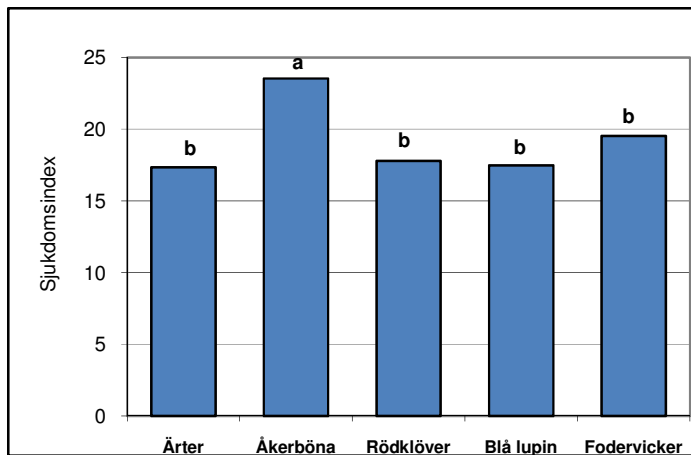


Fig. 3. Sjukdomsindex på rötter av åkerbönor odlade det fjärde försöksåret efter ärter, åkerböna, rödklöver, blå lupin eller fodervicker som förfrukt. Staplarna visar medelvärden av sjukdomsindex på de tre försöksplatserna. Bokstäverna ovanför staplarna visar Duncan-gruppering ($P \leq 0,05$). Medelvärden med samma bokstav är inte signifikant åtskilda.

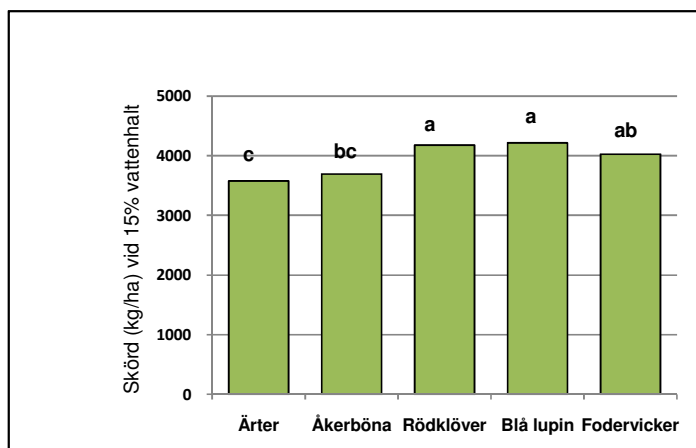


Fig. 4. Skörd av åkerbönor odlade det fjärde försöksåret efter ärter, åkerböna, rödklöver, blå lupin eller fodervicker som förfrukt. Staplarna visar medelvärden av skörd på de tre försöksplatserna. Bokstäverna ovanför staplarna visar Duncan-gruppering ($P \leq 0,05$). Medelvärden med samma bokstav är inte signifikant åtskilda.

För ärter var sjukdomsindex signifikant högre efter ärter som förfrukt jämfört med övriga förfrukter (fig. 5). Rödklöver och blå lupin som förfrukter gav lägst sjukdomsindex i ärt. Skörden av konservert var generellt hög men ändå signifikant lägre efter ärt och fodervicker som förfrukter (fig. 6).

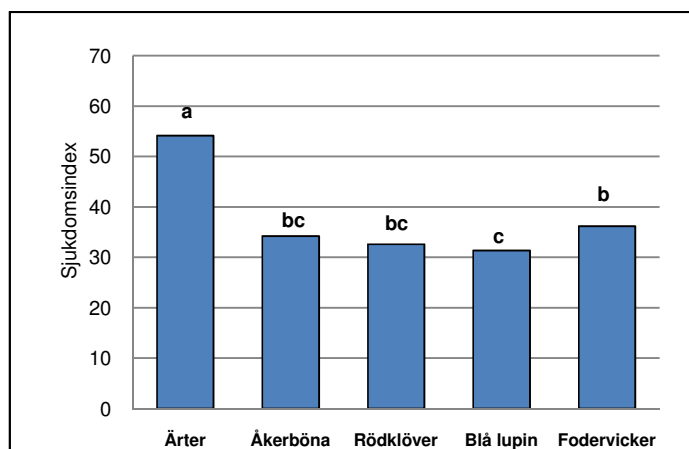


Fig. 5. Sjukdomsindex på rötter av ärter odlade det fjärde försöksåret efter ärter, åkerböna, rödklöver, blå lupin eller fodervicker som förfrukt. Staplarna visar medelvärden av sjukdomsindex på de tre försöksplatserna. Bokstäverna ovanför staplarna visar Duncan-gruppering ($P \leq 0,05$). Medelvärden med samma bokstav är inte signifikant åtskilda.

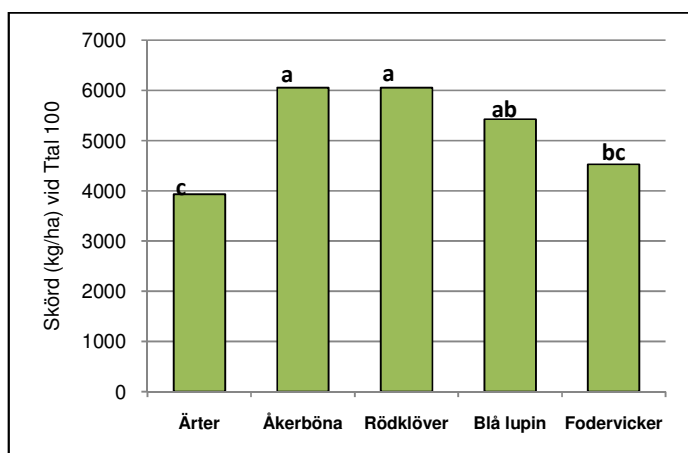


Fig. 6. Skörd av ärter odlade det fjärde försöksåret efter ärter, åkerböna, rödklöver, blå lupin eller fodervicker som förfrukt. Staplarna visar medelvärden av skörd på de tre försöksplatserna. Bokstäverna ovanför staplarna visar Duncan-gruppering ($P \leq 0,05$). Medelvärden med samma bokstav är inte signifikant åtskilda.

Förekomst i *Findus* odlingsområde

Utdrag från Findus databas över jordtester inför ärtodlingssäsongerna 2009-2011 visade att *Phytophthora* fanns i mellan 2,0 till 4,5% av alla testade jordprov. Även *A. euteiches* fanns i hälften eller fler av dessa prov. Inget talar för att den geografiska utbredningen av *Phytophthora* skulle skilja sig åt från den för *A. euteiches*. Patogenen observerades också under projektets gång i prover från Västergötland, och det finns ingen anledning att tro att den är begränsad till sydligaste Sverige.

Tabell 1. Förekomst av *Aphanomyces* och *Phytophthora* rottröta i jordprov i biotest i växthus åren 2009-2011.

Odlingssäsong	Totalt antal prov	Prov med <i>Phytophthora</i> rottröta	Prov med <i>Aphanomyces</i> rottröta	<i>Phytophthora</i> och <i>Aphanomyces</i> ^a
2009	1079	36 (3.3%)	286 (27%)	25
2010	1017	20 (2.0%)	249 (25%)	9
2011	1007	45 (4.5%)	257 (23%)	37

a: värdet representerar prov inkluderade i kolumnerna med värden för *Phytophthora* respektive *Aphanomyces*.

Molekylära analyser och artbeskrivning

De fylogenetiska analyserna bekräftade att isolaten vi samlat in hör till en tidigare obeskriven art. Eftersom vi bara hade 13 isolat gick vi inte vidare med populationsgenetiska analyser, men vi konstaterade att det fanns en viss inomartsvariation både i den nukleära och den mitokondriella genen som analyserades för alla 13 isolat. Denna genetiska variation skulle kunna antyda att patogenen vi har att göra med är naturligt förekommande i Skånes jordar. och därmed uppvisar en genetisk variation i populationen, alternativt är en nykomling men där flera individer etablerats. För vidare detaljer hänvisar vi till artikeln i Plant Disease.

Resistensscreening

Inledande screening av genbanksmaterial följdes upp med experiment där de preliminärt bästa och de sämsta linjerna av varje växtslag jämfördes i replikerade försök. Resultaten är inte slutgiltigt analyserade för alla grödor, men det står klart att den starkaste skillnaden i

symptom mellan olika linjer återfanns i åkerböna, där spännvidden är helt symptomfria plantor till mycket starkt angripna. Också i ärt, kikärt och lins kan man se reproducerbara och statistiskt signifikanta skillnader i symptom mellan sorter, men den övergripande bilden är att samtliga testade linjer är mottagliga. För åkerböna inkluderades några aktuella sorter på den svenska marknaden i försöken (förutom genbanksmaterialet), och intressant nog återfanns både starkt resistent och starkt mottagliga sorter bland dessa. Eftersom åkerböna är en gröda som ökar i odling i Sverige gick vi vidare med resultaten och testade även ett par sorter (Tattoo som var resistent och Laura som var mottaglig) mot hela isolatsamlingen. Starka resistensgener i växter kännetecknas ju ofta av att de bara fungerar mot vissa genotyper av den angripande patogenen. Resistensen visade sig ha effekt mot samtliga isolat, dock var inte alla plantor av den resistenten sorten helt symptomfria.

Diskussion och slutsatser

I växtföljdssammanhang pekas ofta åkerböna ut som en ersättare till ärt vid förekomst av ärtrottröta, men resultaten från undersökningen visar med all önskvärd tydlighet att det inte alltid är lämpligt. Den sedan tidigare okända arten *P. pisi* angrep kulturväxterna ärt, åkerböna och fodervicker i patogenitetstester och växtföljdsförsök. Patogenen som orsakar ärtrottröta, *Aphanomyces euteiches*, infekterar inte åkerböna, men om *P. pisi* finns närvarande i jorden finns det stor risk för skördeförstöring. *P. pisi* överlever i jorden som oosporer och eftersom dessa kan överleva länge i jord är det viktigt att undvika uppförökning på liknande sätt som för *A. euteiches*. Den närbesläktade patogenen *Phytophthora sojae* förorsakar globalt stora skördeförstöring i intensiv odling av sojabönor och stora resurser läggs på att undvika och bekämpa angrepp. Den för näringen mest uppenbara slutsatsen är att anpassa växtföljden och ta hänsyn till smittoläge av *P. pisi* i jorden innan sådd av åkerböna. Val av resistent sorter kan också i framtiden bli en strategi i praktisk odling.

I fältförsöken var det tydliga skillnader i angrepp av *P. pisi* och slutlig skörd i både åkerböna och ärt efter de olika förfrukterna. Skörden av åkerböna var lägre efter förfrukterna ärt, åkerböna och fodervicker, som alla är värdväxter för *P. pisi*. Vid odling av ärt efter förfruktåren komplicerades förhållandena av att både *A. euteiches* och *P. pisi* hade uppförökats av värdväxterna ärt och fodervicker. Det är även tänkbart att den djuprotade förfrukten åkerböna inverkar positivt på jordstrukturen och medförde lägre vattenmättnad och mindre infektion på den efterföljande ärtgrödan trots en hög smittonivå.

Skördarna av både ärt och åkerböna det fjärde året blev högre än förväntade, speciellt i de led där mottagliga förfrukter hade odlats. Dessa resultat kan jämföras med liknande försök som utfördes för tio år sedan i samma fält som ett av fältförsöken i detta projekt. Syftet med försöken i dåvarande projekt (Levenfors, J. 2003) var att utröna effekten av olika baljväxtförfrukters inverkan på *A. euteiches*. Då resulterade odling av förfrukterna åkerböna, fodervicker och ärt i en då oförklarlig skördeminskning på 25-30% i efterföljande åkerböna. Motsvarande skördeminskning i åkerböna i samma fält i detta projekt var ca 20% och förklaras av ett angrepp av *P. pisi*, som med stor sannolikhet fanns i fältet också för tio år sedan.

Sammantaget tyder dessa resultat på att storleken på skördeförstöringarna orsakade av *P. pisi* varierar ganska starkt med årsmånen. Man kan tänka sig att det har varit relativt torrt i marken under den tidiga tillväxtperioden och därmed har inte effekten av patogenerna blivit så stor som förväntat. Under april och maj regnade det endast 36 resp. 30 mm, vilket är lägre

än medelnederbörden för området. Både *Aphanomyces* och *Phytophthora* gynnas av vatten och orsakar kraftiga skördeföruster om det regnar mycket under grödans känsliga utvecklingsstadier före blomning. Rikligt med regn under senare delen av säsongen kan däremot även ha en mildrande effekt på skördeföruster, eftersom växten försörjs med vatten trots skadat rotsystem.

Stora variationer i resistens kunde mätas i olika sorter av åkerböna och det är uppmuntrande med tanke på svårigheterna att bekämpa angreppen. Detta är i likhet med *P. sojae* och sojaböna där resistensförädling är den enskilt viktigaste åtgärden mot angrepp. Inga eller endast små skillnader i resistens mot *P. pisi* kunde mätas i ett urval av ärtlinjer, vilket förefaller vara samma som för *A. euteiches* och ärt. Ett antal sorter av åkerböna har testats i sortförsök i fält i år som verifierar skillnaderna.

Slutligen förtjänar det också att nämnas att resultat från projektet gett uppslag till grundläggande forskningsprojekt och internationella samarbeten kring värdspecificitet i *Phytophthora* och resistensgenetik i åkerböna.

- En ny rotpatogen på ärt och åkerböna har beskrivits: *Phytophthora pisi* sp.nov.
- Värdväxter förutom ärt och åkerböna är fodervicker, lins och kikärt.
- Lusern, lupin, käringtand, klöverarter, vanlig grön böna var resistent mot angrepp.
- Resistensscreening tyder på stor variation i marknadssorter av åkerböna, men små eller inga skillnader hos ärt.
- Resultat i fältförsök verifierade patogenitetstesterna och ärt, åkerböna, fodervicker angreps i fält av *P. pisi*.
- Skörden av åkerböna påverkades negativt av förfrukterna ärt, åkerböna och fodervicker trots att det torra vädret gav en sen infektion av *P. pisi*.
- I växtföljder på jord smittad med den oosporbildande *P. pisi* bör dessa tre kulturväxter behandlas som samma och inte odlas oftare än vart åttonde år eller längre vilket är rekommendationen för *A. euteiches*.

Vetenskapliga- och populärvetenskapliga publikationer

Heyman, F., Blair, J.E., Persson, L., och Wikström, M. 2013. Root rot of pea and faba bean in southern Sweden caused by *Phytophthora pisi*, sp. nov. Publicerad i manuskriptform online i Plant Disease, <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-12-0823-RE>.

Accepterad för publicering i pappersupplagan.

Ny aggressiv art orsakar rotröta i både ärt och åkerböna. *Arvensis* 3, 2010.

Sortskillnader i känslighet för rotröta i åkerbönor. Artikel i *Arvensis* nr. 2, s. 33, 2012.

Internationell konferenspresentation

Fredrik Heyman: 9th conference of the European Foundation for Plant Pathology; Evora, Portugal, Nov 15-18 2010. A new *Phytophthora* species causing root rot in pea and other legumes.

Övrig resultatförmedling till näringen

“Rotröta i ärt och åkerböna”. Föredrag av Mariann Wikström vid ett rådgivarmöte anordnat av Jordbruksverkets Växtskyddscentral i Alnarp 2010-03-18.

“Strategier mot skadegörare i ärter”. Föredrag av Mariann Wikström vid kursen “Fixa proteinet själv” anordnad av Greppa Neringen i Stockholm 2010-11-29.
<http://www.greppa.nu/download/18.4bdd0ace12e454f491d80001303/Mariann+Wikstr%C3%B6m.pdf>

“Svamp och insekter i åkerbönor”. Föredrag av Mariann Wikström vid Växjö möte 2010-12-07.
http://partnerskapalnarp.slu.se/ekonf/20101207/4_Wikstrom.pdf

“Skadegörare i ärter och åkerbönor”. Föredrag av Mariann Wikström vid ett rådgivarmöte anordnat av Jordbruksverkets Växtskyddscentral i Kalmar 2011-02-09.

“Svamp och insekter i åkerbönor”. Föredrag av Mariann Wikström vid ett rådgivarmöte anordnat av Jordbruksverkets Växtskyddscentral i Alnarp 2011-04-06.

“Svamp och insekter som kan ställa till med problem i odling av åkerbönor”. Föredrag av Mariann Wikström vid ett seminarium “NO Soy – närodlad protein” som anordnades av LRF Skåne tillsammans med Partnerskap Alnarp och Hushållningssällskapet i Skepparslöv, Kristianstad 2011-08-31.

“Rotpatogener i åkerböna och ärt”. Föredrag av Mariann Wikström vid ÖSF-konferensen i Linköping 2011-11-29.
<http://www.forsoken.se/Konferens/OSF/2011/06-Rotpatogener%20i%20%C3%A5kerb%C3%B6na%20och%20%C3%A4rt.pdf>

Presentation för rådgivare och lantbrukare av Mariann Wikström vid Hushållningssällskapens Logårdsdagar i Grästorps 2012-07-03.

“Rotpatogener i åkerböna och ärt”. Föredrag av Mariann Wikström vid Hushållningssällskapens Framtidsdagar i Karlstad 2012-09-25.

“Rotröta i ärt och åkerböna - *Phytophthora pisi*”. Poster av A.-K. Arvidsson, F. Heyman, L. Persson och M. Wikström, som presenterades på Borgeby Fältdagar 2011 i Jordbruksverkets

monter och 2012 i Findus monter.

Presentation vid Findus Sverige AB´s årliga vintermöte 2010, 2011 och 2012 för odlingskonsulenter och på Findus odlardagar för kontraktsodlare 2012.

“Rotröta på ärt och andra baljväxter orsakade av en ny Phytophthora-art”. Presentation för rådgivare m.fl av Fredrik Heyman på växtskyddsdag på SLU, Uppsala, våren 2009.

Övriga referenser

Levenfors, Jens (2003). *Soil-borne pathogens in intensive legume cropping - Aphanomyces spp. and root rots*. Doctoral thesis, Uppsala : Sveriges lantbruksuniv., Acta Universitatis agriculturae Sueciae. Agraria, 1401-6249 ; 393
ISBN 91-576-6446-3