

Slutrapport för projekt: Rhizoctonia solani - Marksmitta finns det, vilka stammar förekommer? SLF Dnr 0242016

Bakgrund

Svampen *Rhizoctonia solani* är en allvarlig skadegörare i potatis. Angrepp i tidigt stadium av potatisplantans utveckling orsakar vad som i dagligt tal kallas groddbränna. Symptomen utgörs av frätskador på stoloner och stjälkar. Kraftigt angrepp leder till att groddar och stolonspetsar helt snörs av och dör varvid sidoskott i bästa fall utvecklas. Ibland kan skadorna vara så allvarliga att plantorna inte alls kommer upp så att mistor i fältet uppstår. Om mistorna är mycket omfattande kan totalskörden bli reducerad. Vid lindrigare angrepp av groddbränna medför kompensationsväxten att totala avkastningsnivån inte påverkas. Knölansättningen kan dock bli mera ytlig och storleksfördelningen kan också påverkas. Då plantorna mognar utsöndras flyktiga substanser från knölna vilket stimulerar bildning av svampens vilstadium, sklerotier. Dessa ytliga, svarta mycelstrukturer kallas lackskorv. Det största produktionsbortfallet utgörs oftast av de kvalitetsförsämringar i skörden som svampangreppet medför. Mängden säljbar vara kan starkt reduceras genom uppkomsten av missformade, gröna och lackskorvsangripna knölar. Nettoskörden kan därigenom bli avsevärt reducerad.

Smittan kan vara såväl utsädes- som markburen. Normalt utförs rutinmässig betning av utsädet mot utsädessmitta av *R. solani*. Den markburna smittan anses enligt utländska studier kunna hållas på en låg nivå med 3-4 potatisfria år i växtföljden. Enligt rådgivare i södra och mellersta delarna av Sverige är dock skadeverkningarna av *R. solani* mycket allvarliga, trots att potatis inte återkommer oftare än vart 4:e år i växtföljderna och att utsädet betas kemiskt. Odlarna misstänker att marksmitta är orsak till angreppen, trots rekommenderad växtföljd, eller att de kemiska preparaten upphört att vara effektiva.

Med ledning av litteraturuppgifter och egna erfarenheter förefaller det inte särskilt sannolikt att den kemiska bekämpningen skulle ha varit verkningslös mot utsädessmitta om den utförts korrekt. Förekomst av marksmitta som orsak till skadorna kan därför inte uteslutas.

En komplicerande faktor beträffande *R. solani* är att den förekommer i flera olika distinkt skilda stammar, s k anastomosgrupper, AG. Den allt dominerande gruppen på potatis kallas AG-3. Denna typ är tämligen värdspecifik på potatis och är enligt utländska uppgifter den enda som bildar lackskorv på knölar. AG-3 kan alltså spridas med potatisutsädet medan andra grupper endast är markburna. De kan angripa och skada potatisrötter, stoloner och stjälkar. Dessa AG har krav på högre marktemperaturer än AG-3 som är mera lågtemperaturtolerant.

Förekomsten av marksmitta av *R. solani* i olika regioner och inflytandet av växtföljd och förfrukt är inte studerad i Sverige. Vilka stammar av *R. solani* som förekommer i Sverige har aldrig kartlagts.

De frågeställningar som ställdes i ansökan och som avsågs bli belysta i denna inledande två-åriga studie som pågick under 2003 -2004 var:

1. Förekommer marksmitta av *R. solani* i Sverige?

2. Vad utmärker de regioner, fält resp. fläckar och stråk i fälten där marksmitta påvisats?
a) växtföljd? b) jordart? c) temperatur och nederbörd? d) odlingsteknik? e) näringstillgång? f) vattentillgång?
3. Vilken/vilka stammar av *R. solani* förekommer?

Material och metoder

Jordprovtagning

Provtagningen av jord från olika fält i södra och mellersta Sverige skedde med hjälp av lokala rådgivare, hushållningssällskap och enskilda företagare. Fält med en känd historia av tidigare angrepp av *R. solani* någon gång i växtföljden valdes. I några regioner togs som jämförelse även jord från fält där problem inte förekommit. Prov togs från fläckar i fälten (således inga generalprov) med hjälp av jordprovtagare: 36 stick till 15cm djup med 1m lucka från en yta av ca 5x5m. Volymen jord blev på detta sätt ca 3L per prov. Normalt togs prov från 3 fläckar i de fält som ingick i studien. Jordprovtagaren rengjordes med vatten mellan varje provtagningsplats (fläck). Platsens läge fastställdes med hjälp av GPS eller märkning på kartor. Jordprov togs vid olika tidpunkter i olika distrikt. Vid provtagning på våren hade minst en vinter förflutit sedan föregående potatisgröda, vid provtagning på hösten skedde detta ibland direkt efter skörd av en potatisgröda. Jordproven förvarades så mörkt och svalt som möjligt under hantering och transport till Umeå. Där ställdes de in i konstantrum vid +1°C i väntan på analys.

I norra Sverige togs jordprov från institutionens långliggande växtföljdsförsök på Röbbäcksdalen i Umeå samt Ås utanför Östersund på våren 2003. Försöken omfattar monokultur, 3-årig samt 6-årig växtföljd där potatis ingår. Totalt 10 st prov togs från respektive plats, representerande 0 - 5 potatisfria år vid provtagningsstillfället. På våren 2004 togs 10 st. jordprov från fält i Umeås närhet efter samråd med den lokale potatisrådgivaren. Vissa angrepp av lackskorv hade förekommit i skördarna från angivna odlingar. Totalt ingick således 30 jordprov från norra Sverige.

Totala antalet analyserade prov från södra och mellersta Sverige under 2003 och 2004 var 212. Deras ursprung och position i växtföljden i förhållande till potatisgrödorna framgår av nedanstående tabell.

Tabell 1. Antal jordprov från olika regioner i södra och mellersta Sverige samt provtagna fälts position i växtföljden

Region	Antal år sedan potatis odlades					Tot. oavsett tidskategori
	0	0,5	1	2	3 och 4	
Skåne		18	6	7	11	42
Halland		5	3	2	1	11
Västergötland	7	4	3	3	0	17
Östergötland		15	9	3	15	42
Västmanland	27	15	22	20	0	84
Värmland		0	3	7	0	10
Dalarna		4	2	0	0	6
Tot. oavsett region	34	61	48	42	27	212

Analys, fångstplantor

Analysmetoden använder potatis som fångstplantor för smittan. Potatisgroddar får växa genom ett lager med den jord som ska analyseras och efter viss tid registreras eventuella angrepp på groddar, stoloner och groddar. För att undvika smitta från sättknölar användes miniknölar erhållna från meristemplantor. Dessa förmodades vara helt fria från någon smitta. För att verifiera detta antagande inkuberades 40 st. knölar av respektive sort i steril sand enligt nedan. Alla miniknölar erhöles från SPUAB.

Vid de första analyserna under våren 2003 drygades provvolymen ut genom att blanda jorden med steril sand och jord från ett fält där potatis troligtvis aldrig odlats. Hanteringen utfördes med rena redskap i en spritavtorkad rostfri bunke. Var och en av fyra krukor rymmande 750 ml fylldes med 2 dl av blandningen. Fyra stycken miniknölar av samma sort placerades på detta lager. Två sorter, två krukor av varje, användes till respektive prov. Under våren ingick miniknölar av sorterna Early Puritan, Bintje och King Edward. Ovanpå miniknölarna fylldes på med ytterligare 5 dl av provblandningen. Fyra st. krukor med miniknölar i enbart steril sand användes som kontroller för varje dag då inlagring enligt ovan skedde. Krukorna vattnades till mättnad och ställdes i mörker i konstantrum vid +10°C. Därefter vattnades krukorna mera sparsamt vid behov. Jordproven inlagrades under maj - juni och avlästes under juni -september -03.

Resultaten från våranalyserna visade att det i många fall endast var angrepp i en av de fyra krukorna från samma prov och oftast var då samtliga fyra plantor i krukorna angripna. Plantorna i de övriga tre krukorna kunde vara helt friska. Detta tolkades så att den smitta som funnits i en kruka uppförökats och spridits till alla plantor i samma kruka. Med fyra krukor till ett prov kunde då en 5-gradig kvantitativ skattning av smittomängden i provet erhållas (0 - 4). För att öka analysmetodens känslighet förändrades den något till hösten 2003. Då användes åtta små plastkrukor, 7,5 x 7,5 cm, vilket möjliggjorde en 9-gradig kvantitativ skala (0 - 9). Jorden blandades om ordentligt före analys men användes från och med hösten 2003 utan spädning med annan jord och steril sand. I botten på de små krukorna fylldes 0,5 dl jord, därpå placerades 2 st. avgroddade meristemknölar diagonalt i krukorna. Därefter täcktes dessa med 1,4 dl av jordprovet. Sorterna Roscor, Sava, Mandel, Matilda, Hertha och Early Puritan användes som fångstplantor till analyser hösten 03 och två sorter användes till varje prov, 4 st. krukor av varje. Proverna inlagrades under oktober - december 2003 och avlästes under januari - mars 2004. Vid analys av jordprov tagna under 2004 användes samma metodik som under hösten 2003, dvs provet fördelades i 8 små krukor till varje prov. Jordprover tagna på våren inlagrades under perioden 11 maj - 28 juni och prover tagna på hösten inlagrades från slutet av augusti till början av november -04. Det sist inlagrade provet avlästes i februari 2005. Sorterna King Edward och Bintje användes huvudsakligen under 2004. I några fall kompletterades med Ovatío. Ingen avgroddning utfördes.

Som ovan angivits inkuberades krukorna i konstantrum vid +10 C. De först hanterade proven togs fram och avlästes efter ungefär 6 - 7 veckor på försommaren 2003. Denna inkubationstid hade använts i utländska studier med annat fångstmaterial. De flesta krukorna fick emellertid stå över sommaren och kom att avläsas efter minst 10 veckor. Den längre inkubationstiden underlättade avläsningen, varför den har använts i de fortsatta studierna.

Registrering av angrepp på fångstplantorna har utförts genom att stjälpas upp krukorna med jord och plantor på ett rent pappersark. Allt plantmaterial har därefter försiktigt frilagts och lyfts över på ett litet finmaskigt såll och sköljts av i rinnande vattenledningsvatten. En noggrann granskning av varje plantdel har därefter skett under lupp. Registrering av frätskador, mycel och sklerotier på stoloner, groddar, stjälkbaser, rötter och knölar har skett i en 4-gradig skala där 3 avsett kraftigt angrepp och 0 inget angrepp. Verifiering av skadeorsak har skett genom att under lupp preparera fram en liten bit frätskadad vävnad, mycel eller sklerotie som efter ytdesinfektion placerats på artificiellt tillväxsubstrat, agar, där antibiotika tillsatts för att minska bakterietillväxt. Efter inkubation i rumstemperatur någon vecka syns det karaktäristiska utseendet hos kolonier av *R. solani*, vilket bekräftar infektionsorsak hos plantorna. I studiens inledningsskede gjordes mycket stora mängder överföringar till agar, men då erfarenhetskunskaperna ökade övergick verifieringen till ett fåtal vävnadsprov från varje misstänkt positivt prov. Genom detta förfarande har ett stort antal agarkulturer av *R. solani* med olika ursprung erhållits. Enbart genom sitt växtsätt på agar går det inte att särskilja de olika stammarna av svampen åt. I enlighet med ansökan om fortsatt bidrag under 2004 etablerades därför samarbete med Växtskyddslaboratoriet i Saknadinavien AB, Marina Usoltseva, för att få utfört diagnostiseringsarbete med hjälp av PCR-teknik.

Analyser, detektion av *R. solani* med hjälp av PCR-teknik

Två olika metoder för att extrahera DNA från renkulturer av svampen jämfördes. Den ena utnyttjade ett färdigt analyspaket: "DNAase Plant Mini Kit" och i den andra metoden följdes EU-protokollet för rödröta på jordgubbar, *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*. Båda metoderna visade sig användbara och möjliga för konventionell PCR-analys, men båda hade vissa nackdelar. Den förstnämnda gav ganska lite DNA, men av mycket hög kvalitet, medan den andra metoden extraherade mycket DNA, vilken dock innehöll mer föroreningar. Totalt analyserades 17 olika kulturer med ursprung från insamlade jordprov.

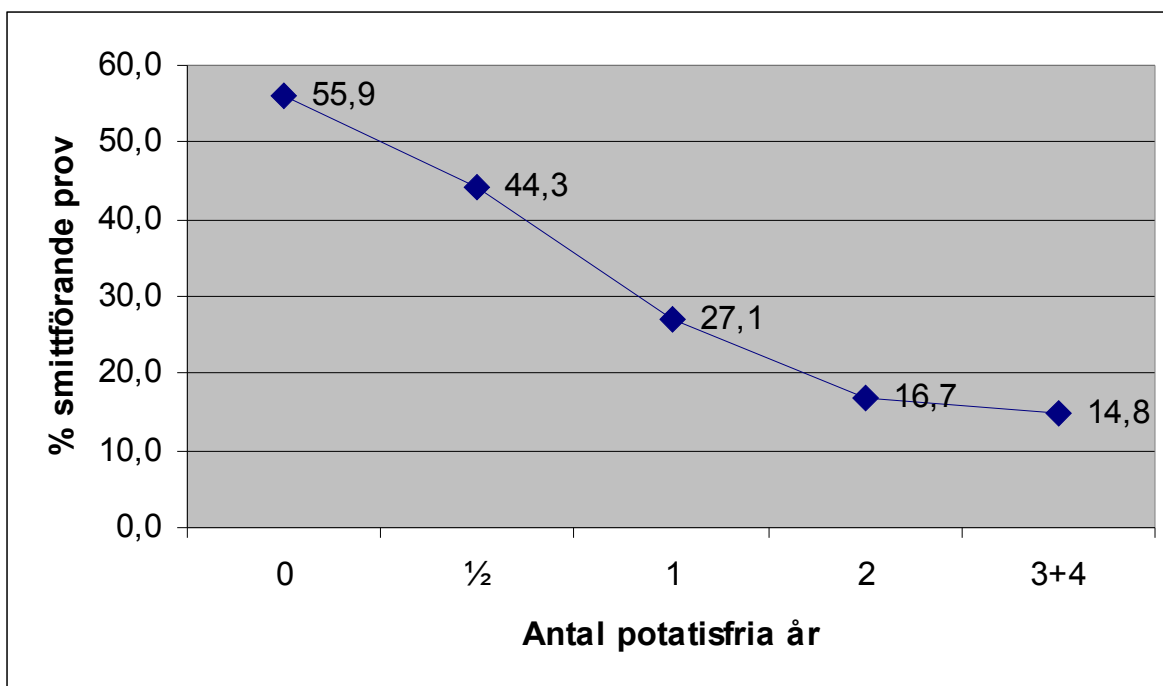
För extraktion av DNA från naturligt och artificiellt infekterad jord prövades flera olika buffertar, fällnings- och reningsmetoder i avsikt att öka utbytet av DNA. Totalt analyserades 30 jordprov.

Uppfödning av *R. solani* AG3-specifikt DNA skedde enligt en publicerad PCR-metod som modifierades något med avseende på temperatur och tidsintervaller. Totalt utfördes 260 PCR-analyser.

Resultat och diskussion

Inget angrepp uppstod i någon av kontrollkrukorna där meristemknölar satts i steril sand. Det finns därför ingen anledning att förmoda att miniknölarna varit smittförande. Alla sorter angreps och några sortskillnader i resistens framkom inte. Inte i något av proven som tagits i Jämtland och Västerbotten kunde smitta påvisas. Förnyad provtagning och analys kommer att ge besked om detta varit tillfälligheter.

Antalet jordprov från södra och mellersta Sverige varierade mellan regionerna och var för litet inom respektive position i växtföljden för att en länsvis resultatredovisning skulle vara lämplig, se Tabell 1. Totala andelen smittförande prov från södra och mellersta Sverige i respektive tidskategori avseende antal år sedan potatis sist odlades på fältet redovisas därför i Figur 1.



Figur 1. Procent jordprov med påvisad smitta av *R. solani* från fält i södra och mellersta Sverige 2003 och 2004. 0 potatisfria år avser provtagning på hösten direkt efter en potatisgröda, 1/2 avser jordprov tagna på våren efter en potatisgröda. För antal observationer i varje referenspunkt, se Tabell 1.

I figuren redovisas endast prov där smitta av *R. solani* verifierats genom odling av angripen vävnad på artificiellt näringssubstrat. Som framgår av figuren avklingar smittan med stigande antal år sedan potatis odlades. Av Tabell 1 kan utläsas att antalet prov som analyserats inom respektive tidskategori inte var lika många. Proven var inte heller jämnt fördelade inom region och tidskategori. Det sammantagna resultatet överensstämmer väl med utländska studier. Huruvida den smitta som uppenbarligen kan finnas efter 3 - 4 potatisfria år är tillräckligt omfattande för att kunna ge skador under praktiska fältförhållanden går inte att avgöra. I dessa studier skapades avsiktligt en mycket gynnsam utvecklingsmiljö för svampen genom att hålla temperaturen låg under mycket lång tid. Inkuberingen skedde också i mörker vilket medförde att fångstplantorna hölls kvar i ett mottagligt stadium under lika lång tid.

En stor mängd andra svampar förekom också vid odlingen på agar. Bland de vanligaste av dessa övriga var *Cylindrocarpon destructans* och *Colletotrichum coccodes*. I några fall fanns starka indikationer att den förstnämnda av dessa orsakat frätskador liknande groddbränna av *Rhizoctonia* på stjälkarna. Detta behöver dock säkerställas genom experiment där dessa symptom återskapas på fångstplantor via artificiellt infekterad jord.

Diagnosticering av *R. solani* AG-3 från renkulturer på agar med hjälp av PCR-teknik har hittills inte varit helt otvetydig. I en första omgång erhöles positivt utslag för isolat från fem kulturer med ursprung från jordprov tagna våren 2003 samt för ett testisolat av AG-3 från England medan två andra *R. solani* -isolat från jordgubbar var negativa. Detta föreföll korrekt. I en andra omgång analys av 11 kulturer från jordprov erhöles inte något positivt utslag med PCR-metoden trots att flera av isolaten orsakat sklerotiebildning på knölar. Enligt alla tillgängliga uppgifter borde de då tillhöra AG-3. Förnyad analys av dessa kulturer kommer att ske.

Utveckling av metodik för direkt analys av *R. solani*-smitta i jord mötte vissa svårigheter. Inget av de förmodat naturligt smittförande jordproven gav något positivt utslag. Metodutvecklingsarbete utfördes därför med artificiellt infekterad jord. Metoden behöver modifieras ytterligare för att komma ner till önskvärda detektionsnivåer.

Publikationer och övrig resultatförmedling till näringen

Resultaten har sammanfattats i en populärvetenskaplig artikel: "Marksmitta av *Rhizoctonia*" i *Potatis och Grönsaker*, nr 3, 2005. Vetenskaplig publicering planeras då mera data från den fortsatta inventeringen insamlats.

Resultaten har delvis eller helt presenterats för odlare och rådgivare vid fyra potatisodlarmöten: Potatisodlardag på Ås dec 2004, Potatisodlardag på Lundsbrunn mars 2005, Potatisdag hos Lovanggruppen juli 2005 och Potatisdag på Vallersta bygdegård dec 2005 samt ingått i konferensföredrag vid två tillfällen: Potatiskurs i Nässjö okt 2004 och Potatisdag på Bäckaskogs slott aug 2005.

Ekonomisk redovisning och fortsatt verksamhet.

Till denna studie hade SLF beviljat bidrag med 550 kkr årligen, dvs totalt 1 100 kkr. Under 2003 och 2004 förbrukades 969 kkr av SLF-bidraget och SLUs motprestation var 603 kkr. Resterande SLF-bidrag, 131 kkr, användes för att kunna fortsätta jordprovtagning och analys under våren 2005. En ansökan om fortsatta studier rörande marksmitta av *R. solani* hade insänts till SLF och beviljades sedermera bidrag: ***Rhizoctonia solani* - kartläggning av marksmittans varaktighet i Sverige, SLF projektnr V0548089**. Det senare projektet är en fortsättning på den inledande två-åriga studien som nu avrapporteras varför redovisning av de överskjutande medlen kommer att ske i samband med rapportering från detta fortsättningsprojekt V0548089.

Umeå, december 2005, Ulla Bång