

SLUTRAPPORT AVSEENDE PROJEKTET ”UTSÄDESSMITTA AV *PHYTOPHTHORA INFESTANS*”

Projektnummer

S0649004

Projektansvarig: Björn Andersson, Institutionen för skoglig mykologi och patologi, SLU

Medsökande: Anna-Karin Widmark, Institutionen för skoglig mykologi och patologi, SLU

Projektbeskrivning och projektmål

Projektet avser att bestämma förekomst av latent utsädesburen smitta av *P. infestans*. Utsäde med skilda smittograder av *P. infestans* togs fram genom artificiell inokulering av utsädesknölar. Utveckling av symtom följdes genom visuell gradering och andelen latent smitta bestämdes med ELISA och PCR-teknik. I projektet bestämdes också andelen latent smitta i partier av naturligt smittade knölar.

Bakgrund

Phytophthora infestans (PI) som orsakar bladmögel på blasten och brunröta i knölar är en allvarlig skadegörare inom all potatisodling. Bladmögel ger en kvantitativt mindre skörd genom att inlagringen till knölar minskar då assimilationen störs. Infektion av knölar är dock minst lika allvarlig av flera skäl. Ett litet angrepp på blasten kan ge upphov till stora knölangrepp, något som kan medföra totalkassation av skörden. Även mindre angrepp av PI på knölar kan utgöra inkörsport för andra skadegörare som kan ge stora förluster under lagring. En annan viktig aspekt av knölinfektion är att brunrötade knölar är skadegörarens huvudsakliga sätt att överleva från ett år till nästa. Smittade plantor orsakade av infekterat utsäde utgör en viktig källa till initialsmitta för en bladmögelepidemi. Trots att det är troligt att oosporer (som medför att bladmögel kan vara en jordburen sjukdom) bildas i många fält kan man med gott fog anta att det under våra förhållanden fortfarande är överlevnad i knölar som är det vanligaste sättet för PI att övervintra. Det finns två teorier om hur smittan tar sig från knölen upp till plantan. Antingen växer mycel systemiskt med skottet upp och etablerar sig i den nya plantan, eller så sporulerar patogenen på den angripna knölen och de bildade sporangierna infekterar plantan (Andrivon, 1995 och Boyd, 1980).

Det finns stora kunskapsluckor avseende hur olika grader av smitta i utsädesknölar påverkar risken för bladmögel i en potatisgröda. Man kan anta att flera faktorer kan påverka detta. Generellt är smitta från knölar till plantorna ett ovanligt fenomen där fuktighet i jorden, temperatur, sortkänslighet mm har betydelse för infektion av de ovanjordiska delarna. De flesta undersökningar gjorda under fältförhållanden där sambandet mellan knölsmitta och primärsmittade plantor har studerats är gamla. Holländska undersökningar visade att endast 1 % av de infekterade knölar gav infekterade plantor, (Van Der Zaag, 1956). Liknande undersökningar i England gav 21 infekterade plantor från 3260 brunröteknölar, det vill säga 0,6 % (Hirst och Stedman, 1960). Dessa undersökningar är naturligtvis baserat på synlig smitta. Antalet primärsmittade plantor från infekterade utsädesknölar beror på hur stor andel av utsädet som bär på smitta, men också hur kraftigt de individuella knölar är angripna. Troligtvis finns även ett samband mellan hur stor andel av knölar som är smittade och hur angripna de är; flera smittade knölar – kraftigare angrepp i varje knöl. För att en knöl skall kunna ge upphov till en primärinfekterad planta måste den överleva lagringen och tiden mellan sättnings och uppkomst. Om knölen är alltför kraftigt infekterad kan den ruttas bort under lagring eller då den satts som utsäde. Är den å andra sidan endast lite angripen ger den

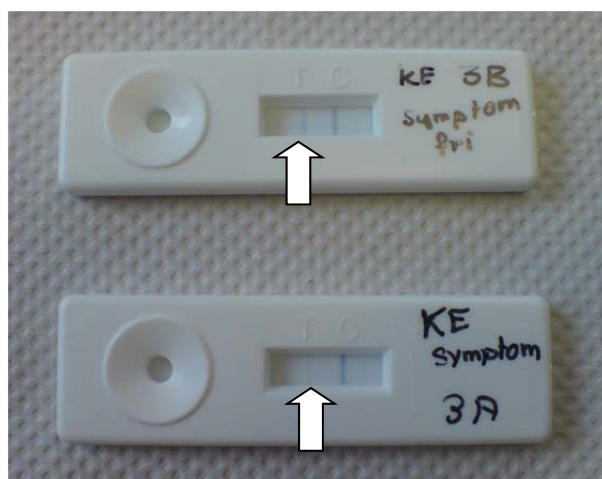
troligen upphov till en frisk planta. Dessutom finns skillnader i förmåga att infektera och överleva i knölar mellan olika isolat av PI. Undersökningar visar att andelen smittade knölar kan ha större effekt på antalet uppkomna plantor än antalet primärangripna plantor (pers. komm. Didier Andrivon, INRA, Frankrike).

När smittan är latent i knölar, det vill säga att infektionerna inte visar symtom, är det självklart inte möjligt att detektera smitta vid normal okulär utsädesbesiktning. Tyska undersökningar har med hjälp av PCR-teknik visat att smittade partier kan bära på stor andel latent infektioner (Adler *et al.*, 1998). Små angrepp som inte utvecklas under lagringen är de som har störst chans att fungera som primärinokulum på våren.

I vårt projekt jämförde vi tekniker för detektering av PI (Elisa och PCR). Vi tittade på känslighet och specificitet, och även på hur lättarbetade metoderna var.

Detektion med kommersiellt test-kit

Ett kommersiellt tillgänglig snabbtest för att påvisa *Phytophthora* i växtmaterial baserat på ELISA-teknik (Alert LFTM *Phytophthora* spp. Adgen Phytodiagnosics, Neogen Europe Ltd) har provats som en jämförelse med PCR.



*Bild 2. Konstaterande av förekomst av PI med hjälp av ELISA – teknik (Alert LFTM *Phytophthora* spp). A = symptomfri knölvävnad. B = knölvävnad med symptom. Pilar visar band indikerande positiv reaktion. Band till höger är kontroll.*

Frysta skalbitar från artificiellt inokulerad King Edward testades också. Från infekterad knöl gav både knölvävnad visande symptom och vävnad utan symptom positivt utslag för förekomst av PI.

Blad från tydliga bladmögelläsioner från ett fältförsök på Ultuna togs in. Försöket inokulerades tre veckor tidigare. Bladvävnad från lesionskanten testades, men Alert gav inget utslag för förekomst av *Phytophthora*. Förklaringen till detta kan vara att det inte fanns något aktivt mycel i bladen på grund av för torr väder. Även själva lesionen testades från ett av bladen, men detta gav inget utslag ens för C (kontrollband) vilket kan bero på för mycket störande fenoliska ämnen i lesionen samt mycket torr vävnad.

ALERT är enkel att använda och kräver ingen kringutrustning. Metoden är avsedd för blad men fungerar även på knölprover. Kostnaden är dock högt, ca 200 kr per prov. Om man ska gå vidare med denna metod måste dock känslighet och specificitet undersökas vidare.

Detektion med PCR-teknik

Vid latent smitta är det av förklarliga skäl svårt att veta var smittan finns i knölen så provet måste vara relativt stort. Detta innebär att man måste ha en detektionsmetod med hög känslighet som till exempel PCR eftersom den infekterade vävnaden blir utspädd med frisk vävnad. Hög känslighet innebär dock också högre känslighet för kontaminering från ett prov till ett annat.

Åtskilliga rapporter visar att man med PCR teknik kan påvisa förekomst av PI i symptomlösa knölar (Niepold & Schöber-Butin, 1997, Adler *et al.*, 1998; Hussain *et al.*, 2005, Keil *et al.*, 2010) i utsädespartier. Man ska dock vara medveten om att metoden bara ger information om DNA av PI finns i knölprovet eller ej. Ett problem med tekniken är att det inte går att skilja på levande och dött mycel. Det är dessutom svårt att koppla PCR-resultaten till risken för primärsmitta. Alla initiala infektioner ger inte upphov till rötade knölar, och många faktorer förutom att patogenen förekommer i knölen påverkar om infektionen skall kunna sprida sig i plantan.

För att kunna utvärdera metoden gjordes jämförande tester på friska knölar respektive på knölar som artificiellt inokulerats med PI. För att få knölar med olika smittonivå användes två olika inokulum-koncentrationer. Knölar (King Edward) inokulerades med sporangie-suspensioner av PI i koncentrationerna 10^2 respektive 10^4 sporangier per ml. Som kontroll sprayades knölar med vatten.



Figur 1. Provtagning av knölar



Figur 2. Pressning av skal i bladpress

Varje knöl besprutades till avrinning. Efter inokulering inkuberades knölar i mörker vid 100 % luftfuktighet i ca 16°C. Efter ca ett dygn fick knölar torka i ca 3 h och placerades

sedan i papperspåsar vid ca 16°C. Efter en vecka visade 40 % av knölnarna inokulerade med den höga sporangie koncentrationen brunrötesymtom. Knölnarna inokulerade med den lägre koncentrationen visade inga synliga symtom alls. Skalprover från knölar med symtom respektive utan symtom togs med hjälp av potatisskalare, se figur 1. Skalbitarna frystes in vid -20°C. Före DNA-extrahering pressades skalbitarna i en bladvals (Pollähne) (Figur 2) och knölsaften frystes.

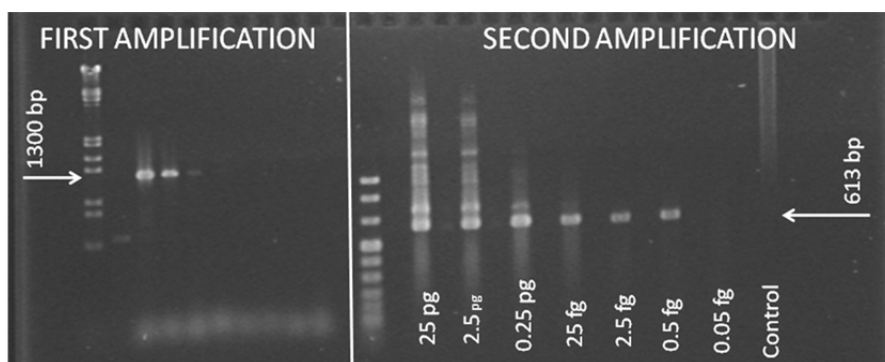
Vi provade olika DNA-extraktionsmetoder:

1. WizardTM GenomicDNA purification kit: protocol for plant tissue, Promega.
2. DNeasy Plant Mini Kit , Qiagen
3. NucleoSpinRPlant, Macherey-Nagel.
4. Ett DNA-reningsprotokoll baserat på CTAB/CHCl₃-extraktion.

Vi såg ingen större skillnad i extraktionseffektivitet mellan de testade metoderna. Vi använde i fortsättningen Promegas DNA purification kit på grund av kostnad och användarvänlighet.

Detektion av smitta med nested PCR

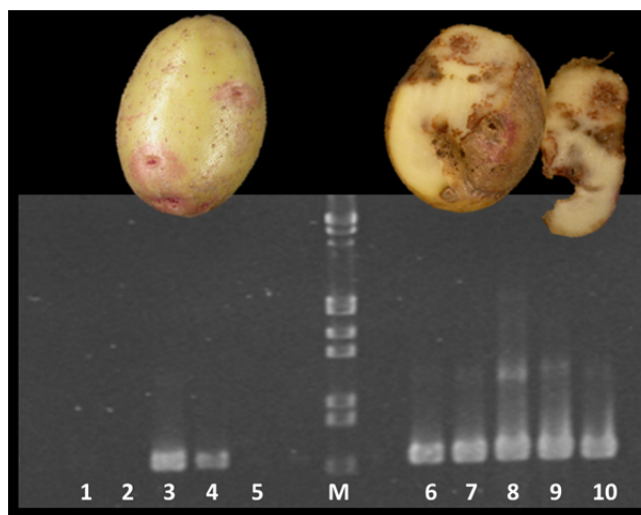
Känsligheten hos två olika PCR-protokoll framtagna för att detektera PI i knölar testades: Hussein *et al.* (2001) samt Niepold & Schöber-Butin (1999, 2001). Det förstnämnda protokollet visade sig 100 ggr känsligare, med en detektionsnivå på 0.5 fg DNA renat från PI mycel. 0.5 fg DNA motsvarar mindre än den mängd DNA som finns i en enda cellkärna av PI (5-10 pg). För att uppnå denna känslighet använde vi så kallad nested PCR, vilket innebär att man kör två PCR reaktioner. Den första ger en mera ospecifik uppförökning av DNA, medan den andra kan sedan specifikt bestämma DNA av PI i provet (figur 3)



Figur 3. Känslighetstest av nested PCR genom spädning av kända mängder PI DNA.
 $pg = 10^{-12} g$, $fg = 10^{-15} g$

PCR detektion av smitta - artificiellt inokulerad knölar

Vid test av artificiellt smittade knölar (King Edward) enligt ovan kunde förekomst av DNA från PI påvisas. Intressant nog visade även till synes friska kontrollknölar (ej inokulerade) förekomst av PI. Dessa knölar bar alltså på latent smitta (Figur 4). För de symptomlösa knölnarna inokulerade med hög inokulumdos gav 27 % svagt utslag i PCR. Observeras bör att av de symptomlösa knölar inokulerade med den lägre inokulumdosen visade 25 % svag utslag i PCR.



Figur 4. Resultat från PCR med DNA från infekterad saft från 2 veckor infekterade knölar (King Edward) med kraftig brunröta, samt saft från obehandlade symptomlösa kontroller (skalbitar) från samma parti. 1-5: prov från symptomlösa knölar. 6-10: prov från knölar med brunrötesymptom. M=storleksmarkör

PCR detektion av smitta – naturligt smittade knölar

Ett insänt prov från ett naturligt brunröte-infekterat parti av sorten Folva har också testats. Enligt odlaren visade ca 5 % av knölarerna i partiet symptom på brunröta. Odlaren rensade bort brunrötade knölar och lagrade in partiet. Ett antal symptomfria knölar skickades in till oss och dessa testades enligt PCR metoden ovan. 25 % av knölarerna i detta parti bar på latent smitta av PI.

Detektion av latent smitta – visuell bedömning

Av det ovannämnda framgår att det är vanligt att man kan detektera PI i symptomlösa knölar med PCR-teknik. Vi vet emellertid inte om det DNA som detekteras är från levande eller dött mycel. Vi ville därför pröva ett annat system för att detektera latent smitta baserat på visuell bedömning. Genom att skära knölarerna i halvor, inkubera dem i fukt-kammare vid 10°C vilket anses vara optimal temperatur för PI att utvecklas i knölvävnad (Kadish & Cohen, 1992) kan man provocera fram synlig röta från latent smittade knölar (Kirk *et al.*, 2001).

Vår hypotes var att tidigt under lagringssäsongen är graden av synlig smitta korrelerad till graden av latent smitta i knölarerna, det vill säga ju fler knölar med synlig smitta desto flera med latent smitta. Vi ville därför studera hur den latent smittan utvecklas under lagring. Under normal kyl-lagring av potatis (4°C) utvecklas synlig brunröta mycket långsamt och latent smitta kan följa med utsädet. En effekt av detta är att bladmöglet inte började spridas runt om i världen förrän potatis började fraktas med kylbåtar. När potatis fraktades utan kylning ruttade infekterade knölar bort under transporten.

Analys av knölparter

Under hösten 2010 togs ett antal knölparter in från olika fält. Den 1 september provtogs ett sortförsök i ekologisk odling i Hedemora. Prover på cirka 100 knölar togs i sorterna Melody, Opera och Cicero. Vid provtillfället var samtliga sorter kraftigt angripna av bladmögel. Angreppen hade startat cirka 1 månad före provtagningen. Prover togs också från en ekologisk odling av Ovatio i Vara den 4:e september. 100 knölar togs från 10 olika platser i

fältet med kraftiga angrepp av PI på bladen. I ett fält i Mosslunda söder om Kristianstad med fungicidförsök i sorten Bintje togs prover i parceller med olika grad av bladmögelinfektion. Proverna togs i obehandlat led och i två fungicidbehandlade led (Shirlan & Revus). Det obehandlade ledet var vid provtagningen total nedvissnat av bladmögel, medan de behandlade leden hade cirka 20 % angrepp.



Figur 5. Provtagning i försöksfält med ekologisk utsädesproduktion

Efter någon månads lagring vid 10 °C kontrollerades alla knölprover avseende förekomst av brunröta. I proverna från Hedemora hittades inga brunrötade knölar. I de sammanlagt 996 knölar från Vara hittades 5 knölar med synlig brunröta, och i proverna från Mosslunda hittades en brunrötad knöl i obehandlat led. Den låga angreppsgraden i den insamlade knölproverna gjorde att vi bedömde det som meningslöst att gå vidare och analysera dem för latent infektion.

På grund av den låga infektionsgraden i den insamlade knölproverna lokaliserades under senhöst och vinter partier med kraftiga angrepp av brunröta. I januari erhöles två partier av sorten Annabelle från två gotländska odlare. Partierna hade analyserats 30 dagar efter upptagning. Parti A hade då i 0,5-6 viktsprocent brunrötade knölar. Parti B totalkasserades då var tredje knöl som skars upp var rötad. I de insända proverna återfanns i parti A 3 knölar av 400 med synlig röta. I parti B var motsvarande siffror 221 av 300!

Fem dagar senare skars knölar utan synliga symptom upp i halvor och synlig röta registrerades. Av parti A skars 185 knölar upp. Ingen knölskiva visade synlig röta. Av parti B skars 80 knölar upp och 3 st visade röta. Knölhalvorna utan symptom placerades i fuktkammare på Jiffi-brätten för att undvika direkt kontakt med vatten. Lådorna med knölhalvorna inkuberades därefter vid 10°C. (figur 6).

Avläsning av försöket gjordes efter 14, 21, 28, 35 dagar. Ingen av de uppskurna knölarerna visade brunrötesymptom under avläsningsperioden. All smitta hade uppenbarligen redan utvecklats till synlig röta redan innan avläsningsperioden.



Figur 6. Testsystem för att provocera fram symptom i latent smittade i knölar vid 10°C

Diskussion

Det är ytterst angeläget att klargöra varifrån primärsmittan kommer. Utan smittkällor – inget bladmögel! Bladmögelpopulationen i Sverige skiljer sig från de populationer som finns i andra delar av världen. Vi har en jämn fördelning av de två parningstyperna av PI, och detta medför att sexuell reproduktion av patogenen förekommer. Vi vet att oosporbildning är vanligt förekommande i svenska potatisfält, och resultat från populationsstudier på PI tyder på att dessa också fungerar som smittkälla under fältförhållanden (Andersson et al, 2009). Det är dock mycket svårt att säga något om hur viktig denna nya smittkälla är jämfört med den utsädesburna smittan. Man kan dock anta att klonal överlevnad i knölar är ett viktigt sätt för aggressiva isolat att övervintra. Knölsmita är dessutom ett sätt för bladmöglet att spridas långa sträckor genom utsädeshandel och aggressiva isolat kan på detta sätt introduceras i potatisodlingar världen över.

Trots mer än 150 års forskning på bladmögel är inte ens mekanismen hur patogenen överförs från knöl till planta helt klarlagd. Den vanligaste förklaringen är att mycel av patogenen växer med skotten och utvecklar symptom på stjälken ovan jord. En annan teori är att den infekterade knölen sporulerar under jord och på så sätt infekterar närliggande plantor (Andrison, 1995). Egna fältobservationer stödjer den senare teorin. Det är väl känt att hög markfukt ger mera tidiga angrepp (Powelson *et al.*, 2002). Detta skulle kunna förklaras av att fritt vatten krävs för att sporangier skall kunna infektera. Däremot borde hög markfuktighet inte påverka hur patogen-mycel växer inuti potatisstjälken. En annan observation är att enstaka angripna knölar kan ge upphov till angrepp på närliggande plantor vid mycket hög markfuktighet. Detta skulle kunna orsakas av att sporangier sprids i markvattnet.

Latent smitta i utsädet komplicerar situationen ytterligare. Latent smitta kan inte bestämmas visuellt vid bedömning av utsädeskvalité. Man kan dessutom anta att det är knölar med svaga infektioner, kanske främst latent infektioner, som kan överleva lagring och som kommer ut i fält vid sättning. En enkel och billig metod att fastställa latent smitta finns inte på grund av höga kostnader per prov och svårigheten att ta representativa prov i stora partier. Våra resultat pekar på att de flesta latent smittade knölar övergår i synlig smitta på relativt kort tid om de lagras vid 10°C. I en amerikansk rapport (Powelson *et al.*, 2002) rekommenderas att lagra utsädesknölar vid 20-22°C under 2-3 veckor innan sättning för att provocera fram synliga symptom från latent smittade knölar. Problemet med representativa prover kvarstår dock.

Med hjälp av PCR teknik kan förekomst av DNA detekteras. Metoden är mycket känslig och specifik, och skulle alltså kunna användas för att upptäcka latent infektioner. I tyska

undersökningar gjorda 2007-2009 undersöktes 17 partier av certifierat utsäde, och det konstaterades att bara tre av partierna var helt fria från *Phytophthora* DNA. I de övriga partierna kunde i genomsnitt ca 10 % smittade knölar påvisas (Keil *et al.*, 2010).

Som tidigare nämnts så är sambandet mellan brunröta och risken för primärsmittade plantor dåligt känt. Det är svårt att få en bra korrelation mellan andel latent smittade knölar och risken för tidiga bladmögelangrepp. I detta sammanhang är det viktigt att komma ihåg att PCR-metoden inte kan skilja på levande och dött mycel.

Slutsatser

Våra undersökningar av detektion av latent smitta av PI i knölar visar att kommersiellt tillgängliga ”diagnos-kit” kan användas för detektion av latent knölinfektion av *P. infestans*. Kostnaden per prov är dock hög. Det kommersiella kit som vi provade baserades på ELISA-teknik.

Ytterligare undersökningar med PCR-baserade metoder för detektion av DNA från *P. infestans* visade att både synlig och latent infektion av *P. infestans* i potatisknölar kan detekteras med PCR. Undersökningarna visade att metoden är mycket känslig och att *P. infestans* ofta detekteras i symtomlösa knölar. Sammantaget kan sägas att resultaten med PCR detektering ger indikationer på att potatis-partier kan innehålla stor andel latent smittade knölar. Vi har inte tittat på utsädespartier, bara kraftigt smittade partier, men andra undersökningar visar på att det även i certifierat utsäde kan finna stora mängder knölar med latent smitta av PI.

Vi vet nu att det kan finnas betydligt mera smitta i ett parti än vad som kan ses med blotta ögat, men vi har varit försiktiga med att gå ut med att latent smitta är vanlig i potatisskörden och till och med i potatisutsädet. Andelen smittade knölar är naturligtvis en viktig faktor i hur stor risken för en tidig start av bladmögelepidemin är i ett fält. Det är dock viktigt att komma ihåg att många andra faktorer, som till exempel väder och odlingsteknik, påverkar detta.

Pågående projekt med anknytning till det slutredovisade

Vi har initierat ett nytt forskningsprojekt för att studera hur knölsmitta påverkar epidemier av bladmögel i potatis. Projektet ”Genetisk diversitet och aggressivitet hos *Phytophthora infestans* i potatisblast och potatisknölar” finansieras av Stiftelsen Lantbruksforskning. Projektet avser att studera hur smitta av PI överförs från infekterad blast till knölar och hur stor del av populationen som smittar knölar. Även studier av hur aggressivitet kan överföras via smittat utsäde ingår. I projektet har utsäde infekterats med olika PI isolat. I fältförsök bestäms plantuppkomst och förekomst av primärsmitta. Utvecklingen av bladmögelpopulationen följs under säsongen med hjälp av DNA-genotypning. Skördeprover tas och inlagras för att användas som utsäde våren 2012 för att studera övervintring.

Preliminära resultat visar på stora skillnader i hur olika isolat påverkar uppkomst av potatis.

Var vi presenterat projekten.

Vi har informerat om projektet på fältvandringar och möten, som till exempel Böslidsdagen i Halmstad och FK-dagen i Kristianstad. Vi har också deltagit i Borgeby fältdagar 2009.

Referenser

- Adler N., Habermayer J. & Zinkernagel V. 1998. PCR techniques used for detection of *Phytophthora infestans* latent infections in potato. In: Huub Schepers & Erno Bouma (eds.), PPO Special Report no. 5, Proceedings of the Third Workshop of an European Network for development of an Integrated Control Strategy of Potato Late Blight, pp. 247-255.
- Andersson B, Widmark A-K, Yuen JE, Nielsen B, Ravnskov S, Kessel GJT, Evenhuis A, Turkensteen LJ, Hansen JG, Lehtinen A, Hermansen A, Brurberg MB, Nordskog B. 2009. The role of oospores in the epidemiology of potato late blight. *Acta Horticulturae* 834: 61-68.
- Andrison D. 1994. Fate of *Phytophthora infestans* in a suppressive soil in relation to pH. *Soil Biol. Biochem.* 26:953-956.
- Andrison D. 1995. Biology, ecology and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil. *Phytopathology* 85: 1053-1056.
- Boyd AEW. 1980. Development of potato blight (*Phytophthora infestans*) after planting infected seed tubers. *Annals of Applied Biology* 95: 301-309.
- Hirst JM, Stedman O, 1960. The epidemiology of *Phytophthora infestans*. II. The source of inoculum. *Annals of Applied Biology* 48, 489-517.
- Hussain S., A.K. Lees, J.M. Duncan and D.E.L. Cooke 2005. Development of a species-specific and sensitive detection assay for *Phytophthora infestans* and its application for monitoring of inoculum in tubers and soil. *Plant Pathology* 54, 373-382.
- Kadish D, Cohen Y. 1992. Over seasoning of metalaxyl-sensitive and metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora infestans* in potato tubers. *Phytopathology* 82, 887-889.
- Kiel S, Benker M, Zellner M. 2010. Latent infection of potato seed tubers with *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. In: H.T.A.M. Schepers (ed.). PPO Special report no 14. Proceedings from the Euroblight Workshop, pp.217-221.
- Kirk WW, Niemira BA, Stein JM. 2001. Influence of storage temperature on rate of potato tuber tissue infection caused by *Phytophthora infestans* estimated by digital analysis. *Potato Research* 44, 86-96
- Niepold F. & Schöber-Butin B. 1997. Application of the one-tube PCR technique in combination with a fast DNA extraction procedure for detecting *Phytophthora infestans* in infected tubers. *Microbiological Research* 152, 345-351.
- Powelson MI, Ludy R, Partipilo H. 2002. Seed borne late blight of potato. On line. *Plant Health progress*, Jan 29-01HM
- Van der Zaag DE, 1956. Overwintering en epidemiologie van *Phytophthora infestans*, tevens enige nieuwebestrijdingsmogelijkheden. *Tijdschrift over Plantenziekten* 62, 89-156.