

Slutrapport för projekt H1133278 *Phytophthora pisi* och andra rotrötepatogener på åkerböna. Inventering, samspelsfaktorer och odlingsstrategier.

Rapportens författare:

Fredrik Heyman, Mariann Wikström, Lars Persson, Anna-Kerstin Arvidsson

Bakgrund

Iden till det här projektet baserades på resultat vi fick i ett tidigare SLF-finansierat projekt, "Phytophthora i ärt –en ny allvarlig rotrötesjukdom i Sverige" (projektnummer H083353). Det var fokuserat på en ny rotrötepatogen på ärt som observerats i fältförsök och jordtester i Skåne och som vi beskrev som *Phytophthora pisi*. I projektet visades i växthusförsök vad som redan misstänkts från fältobservationer: *P. pisi* angriper förutom ärt även åkerböna. Vi observerade i växthusexperiment också mottaglighet för grödorna fodervicker, kikärt och lins. Resistensförädling förblir i de fall den är möjlig den viktigaste åtgärden för att skydda grödor från sjukdomsangrepp, också när det gäller jordburna sjukdomar. Vi screenade därför genbanksmaterial av ärt, åkerböna, kikärt och lins, och såg att de tydligaste skillnaderna i mottaglighet mellan sorter kunde ses i åkerböna. Intressant nog fanns tydliga skillnader också bland sorter på den svenska utsädesmarknaden.

Det här projektet syftade till att ge mer tillämpbar kunskap kring rotröta i åkerbönor. Vi utvecklade metoder för att detektera och kvantifiera *P. pisi* i DNA från jord eller växtprover. Dessa användes för att utvärdera fältförsök med resistent sorter, för att genomföra en inventering av *P. pisi*-angrepp i åkerböna, samt för att undersöka växtföljdseffekter och värdspecificitet i fält. Vi initierade också inledande arbete med att kartlägga och karaktärisera resistensanlag. Kvantifieringarna av *P. pisi* i rötter var ett centralt inslag i projektet. Metodutvecklingen för detta krävde en hel del tid, varför vi fick omfördela resurser och ändra något i den ursprungliga planen.

Material och metoder

Selektiva PCR primrar för *P. pisi*

För att få en stark analysignal valdes arts specifika DNA-sekvenser som finns i högt antal i varje cell. Vanligen används ribosomgenens ITS region för detta syfte. I vårt fall var sekvensskillnaderna gentemot besläktade *Phytophthora* arter för små för att utveckla ett tekniskt välfungerade primerpar. Vi utgick istället från Cox2, en mitokondriell gen (mitokondrier finns också i många exemplar i varje cell) för vilken data fanns om besläktade arter, och där förutsättningarna var bättre. I praktiken hamnar man ofta i situationen att man får nöja sig med primerpar som inte är tekniskt perfekta i alla avseenden.

Ett primerpar utvecklades som amplifierar ett 251 bp fragment. Minst ett baspar i varje primer är unikt för *P. pisi*. Vi utvecklade också en taqmanprob för att möjliggöra ytterligare specificitet i kombination med hög känslighet. Primerparet utvärderades i olika reagenssystem, "vanlig" PCR (förekomsten av band på en gel) samt två kvantitativa (qPCR) system, ett färgbaserat (EvaGreen) och ett med den fluorescerande proben

(Perfecta). Som negativ kontroll användes genomiskt DNA av *P. vignae*. Det är en art som visserligen inte förväntas finnas i Sverige, men vars sekvens i Cox2 genen är mest lik *P. pisi*, och för övrigt identisk med flera andra arter.

Växtgen för normalisering av qpcr från växtprover

För att normalisera mängden *P. pisi* i DNA extrakt från rötter användes en växtgen. Vi ville kunna analysera växthalten i rotprover från olika värdväxter utan att behöva utveckla nya primerpar för varje växt. Ett antal primerpar från litteraturen testades, och efa (referens) uppfyllde våra krav då det gav en PCR produkt från rödklöver, fodervicker, lupin, ärt och åkerböna.

För båda primerpar genomfördes BLAST sökningar och tester på rotprover från fält för att minimera risken för amplifiering av icke önskvärda DNA sekvenser från andra organismer.

Halten *P. pisi* i rotproverna från inventeringen och växtföljdsförsöken beräknades som kvoten av antalet kopior Cox2 från *P. pisi* och efa från växten.

Provhantering och extraktionsprotokoll

Vid kvantifiering av patogener i värdväxten gäller i allmänhet att växtens eget DNA dominerar i provet. Vidare är i regel patogenen koncentrerad till några få "hot spots" vid ett begynnande angrepp. I åkerböna hade vi observerat att missfärgningarna som kännetecknar angrepp av *P. pisi* börjar i rotspetsarna och expanderar inåt-uppåt vartefter angreppet fortskrider. Ett representativt prov är A och O för all provanalys, och kan vara en utmaning när det gäller heterogena ursprungsmaterial som åkerbönrötter från ett fält.

Vi jobbade med fältprov om 20 plantor. För åkerböna avskiljdes huvudroten, då patogenen förväntades finnas framförallt i sidorötterna. Mängden sidorötter som varje planta bidrog med per prov hölls konstant. Materialet frystorkades, och maldes med kulkvarn. Den primära DNA extraktionen gjordes med 0.75 ml malt pulver och 10 ml 3% CETAB extraktionsbuffert, där den i sammanhanget stora mängden ursprungsmaterial valdes för att förbättra provrepresentativiteten. Den fortsatta uppreningen av DNA skedde sen med ett kommersiellt kit (Macherey-Nagel NucleoSpin Plant II) där en delvolym på 400 mikroliter från CETAB extraktionen fick ersätta extraktionsbufferten i kitet. Modifikationer av protokollet fick göras för att hantera åkerböna, där färgämnen från rötterna som vi misstänker stör PCR reaktionen tenderade att följa med genom hela reningsprocessen.

Kvantifiering av *P.pisi* och växtDNA gjordes sen med standardkurva i varje körning och DNA templat i 0.5-1 ng/ul i slutkoncentration i PCR reaktionen.

Inventering av *P. pisi* i åkerböna

Åkerböna är en gröda som ökat i odling i Sverige. För att sätta våra växttuster och enskilda observationer i perspektiv och få ett grepp om relevansen för den praktiska växtodlingen genomförde vi en inventering av *P. pisi* i vanliga åkerbönfält. Jordburna sjukdomar är svåra att diagnosticera i fält, och provtagning av rötter är tidsödande. Vi strävade efter att få en fördelning av växtprover som (grovt) motsvarade åkerbönodlingens

utbredning i Sverige. Med betydande hjälp av rådgivare (Jordbruksverkets Växtskyddscentral, Hushållningssällskapet, Lovanggruppen) fick vi tillgång till geografiska koordinater till ett urval av fält i Skåne, Halland, Västergötland, Östergötland och Uppland.

Vid varje fält gjordes en transekt på 100-150 meter där 20 plantor samlades in på 10 jämnt fördelade punkter. Stjälkarna avskildes och samlingsprovet med rötterna och en del kvarvarande jord packades i plastpåsar i kylväskor, och förvarades kallt till

rentvättning inom 24h och vidare transport till Findus AB inom 72h. Proverna förvarades i frys fram till frystorkning som skedde på Findus AB, varefter det frystorkade materialet skickades till Uppsala. Under 2012 och 2013 samlades 85+72=157 prover in. Proverna från 2013 kom till stor del från fält som tillhörde samma odlare som besöktes under 2012 (detta för att underlätta det praktiska arbetet med odlarkontakt, vägbeskrivningar etc). Alla prover kördes i två replikat i qPCR, och sedan i ett replikat med konventionell PCR. Prover med bara en observation bland dessa tre kördes ytterligare en gång med qPCR (2 replikat). Prover med minst ett positivt resultat i minst två körningar enligt detta schema betraktades som positiva

Mängden *P. pisi* i Inventeringsproverna normaliserades mot DNA-halten i provet. För att få en uppfattning om förekomsten av andra patogener på rötterna, ytsteriliserades färska finrötter och lades på PD-agar. Utväxande kulturer renodlades och identifierades i ljusmikroskop. Inventeringen gjordes på 52 av de 85 prover som togs in 2012.

Resistensförsök i åkerböna i fält

I det tidigare projektet hade ett urval av 12 sorter som finns eller kan vara aktuella på den svenska marknaden testats för resistens mot *P. pisi* i växthus. Åtta av dessa tillsammans med två andra testades i fältförsök på två platser, Ängelholm och Logården, under 2012 och 2013. Fälten var smittade med *P. pisi* baserat på resultat från tidigare jordtester i växthus. Sorterna testades i 24m² stora parceller med fyra upprepningar i varje fältförsök. Innan blomning grävdes 10 plantor upp i varje parcell, och transporterades till laboratoriet samma dag där rotsymptom lästes av och rotprover för PCR analys togs tillvara enligt ovan. För 2012 vägdes även färskvikten för ovanjordiska biomassan baserat på 10-12 plantor per parcell. I Ängelholm 2012 gjordes även sent på säsongen en okulär bedömning. Baserat på beståndets skick i hela parcellen graderades varje parcell på en skala mellan 1 och 5, variabeln benämns här "sen DSI" Skörd mättes för alla parceller båda år. Endast prover från 2012 då symptomgraderingarna gav högst värden, maldes, extraherades och analyserades med qPCR för att kvantifiera *P. pisi*.

Försöken sköttes av Hushållningssällskapet Logården, Grästorps och Hushållningssällskapet i Kristianstad. Försöket på Logården bekostades delvis av Lantmännen SWseed och Scandinavian Seed.

Rotprover från växtföljdsfältförsök

Fältförsök på fält som var naturligt smittade med *P. pisi* anlades 2009 på tre platser i Skåne, under det tidigare projektet. Dessa hade en baljväxtintensiv växtföljd som inleddes med åkerböna på hela försöksytan, följd av upprepad odling av olika baljväxtgrödor under 2 år och ärt och åkerböna på delade parceller det fjärde året. Syftet var att dels testa huruvida värdväxtresultaten från växthus för *P. pisi* var relevanta i fält, dels skatta hur stor skördeminskning man kunde få av *P. pisi* angrepp efter flera års uppförökning. Resultat för avläsning av sjukdomsindex och skörd hade redan visat att det fanns signifikanta växtföljdseffekter av olika grödor som förfrukter till åkerböna respektive ärt som odlades det sista året (se slutrapport för projektet H0833534). Vi visste också att fälten varit smittade inte bara med *P. pisi* utan också *A. euteiches* (som orsakar vanlig ärtrottröta). Från dessa fältförsök hade vi frysta rotprover (ett från varje parcell) från ärt och åkerböna odlade år 4, samt från ärt, åkerböna, fodervicker, blå lupin och rödklöver odlade år 2. Vi beslöt att även analysera dessa prover eftersom resultaten förväntades vara värdefulla för förståelsen av sjukdomen. Dessa prover analyserades inte bara för *P. pisi*, utan även för *A. euteiches*, via en tidigare utarbetad taqman assay.

Jordprover

Varje år testas ett stort antal prover rutinmässigt på Findus AB för förekomst av ärtrottröta, genom att provodla ärter och avläsa sjukdomssymptom. Tanken att kunna detektera jordburna patogener direkt från jorden via DNA extraherat direkt från jord har varit en viktig grundpelare i BioSom programmet som löpt parallellt med detta projekt. Från och med 2008 förs statistik över förekomst av *P. pisi* i växthustesterna, baserat på symptom och den rutinmässiga mikroskopi av ett rotprov som alltid sker då rotrötesymptom observeras. Oosporer från *P. pisi* kan i mikroskop skiljas från *A. euteiches*, och de förekommer regelbundet i saminfektioner. I det förra projektet sattes ett antal delprover av jordproverna åt sidan innan växthustestet och förvarades i kylrum. När växthustesterna var genomförda fanns således information om huruvida de förväntas innehålla smitta av *P. pisi* respektive *A. euteiches*. Baserat på resultaten från växthustestet testade vi nu taqmansystemet för att detektera *P. pisi* i ett antal naturligt smittade och förväntat smittofria prover som extraherades med varierande intensitet (dvs antal DNA extraktioner per jordprov), liksom i spikade prover där vi tillsatt enstaka celler av *P. pisi* direkt till det 0.5 g delprov varifrån DNA extraheras.

Resistensanlag i åkerböna

Under projektets gång har reciproka korsningar genomförts i Spanien mellan sorterna Laura (mottaglig) och Tattoo (resistent). F2 generationen kommer att skördas under 2015 och finnas tillgänglig för framtida projekt för att karaktärisera nedärvningen och "mappa" resistensgener.

Resultat:

Detektions- och kvantifieringssystem

Specificitet: Allmänt gäller att en avvägning måste göras mellan specificitet och känslighet. Den faktor som enklast kan påverkas är den temperatur som används i PCR:en, där högre temperatur ger bättre specificitet men samtidigt sämre amplifieringseffektivitet och därmed känslighet. Vi valde en temperatur där en svag signal fortfarande kunde skönjas från ett DNAProv av rent patogenDNA från *P. vignae*. Eftersom mängden Phytophthora DNA kommer vara mycket lägre i verkliga prover bedömde vi risken för falska positiva detektioner som i praktiken obefintlig. Amplifieringseffektiviteten för analysen var i genomsnitt 89% för EvaGreensystemet och 94% för taqmansystemet. Ner till 10 kopior per PCR reaktion kunde detekteras.

Inventering i åkerbönsfält

Totalt hittade vi *P. pisi* i 14% av växtproverna i fält med åkerböna. Två av de 5 positiva proverna från 2013 kom från odlare som även hade ett positivt prov 2012.

Tabell 1. Provtagningsintensitet och resultat av inventering av *P. pisi* i svenska Åkerbönefält.

Område	# antal prov 2012	# <i>P. pisi</i> detekterat	# antal prov 2013	# <i>P. pisi</i> detekterat	Summa
Skåne/Halland	13	5	16	2	7/29
Västergötland	29	4	25	0	4/54
Östergötland	36	8	25	3	11/61
Uppland	7	0	6	0	0/13
Summa	85	17	72	5	22/157

Den genomsnittliga mängden vi hittade var 6.9 genkopior /ng totalDNA (median 10, min 1, max 610).

Isolering och identifiering på agar av övriga patogener i åkerbönor från 52 av de 85 fälten från inventeringarna i Skåne, Halland, Västergötland, Östergötland och Uppland under 2012 tyder på att det finns en hel del andra arter på rötterna. Den vanligaste rotpatogenen var av släktet *Cylindrocarpon* och fanns i 63% av fälten 2012. Ett annat vanligt släkte var *Fusarium* med följande förekomst på artnivå (frekvens fält) ; *F. avenaceum* 23 %; *F. acuminatum* 42 %; *F. culmorum* 19 %; *F. oxysporum* 8 %; *F. redolens* 13 %. Dessutom hittades *Rhizoctonia* spp. i 10 % av fälten.

Resistensfältsförsöken

Som nämnts analyserades endast proverna från 2012 med qPCR. Med ett undantag hittades *P. pisi* endast i proverna från Ängelholm. Detta försök utmärkte sig också med mycket lägre skördenivå. Tabell x redovisar signifikanta korrelationer mellan olika responsvariabler, analyserade som medelvärden för varje sort, eller på parcellnivå (olika responsvariabler i samma försök).

Tabell 2. Signifikanta ($p < 0.05$) korrelationsvärden mellan olika responsvariabler i resistensförsöken med åkerböna i Logården och Ängelholm 2012 och 2013. DSI=disease severity index. qPCR *P. pisi* avser molekylärt kvantifierad *P. pisi* normaliserat mot halten värdDNA bestämd via kvantifiering av växtgenen efa i samma prov.

Variabel	Korrelerar med
DSI växthus med <i>P. pisi</i> 2008 (8 sorter)	DSI Ängelholm 2012 0.74
DSI Ängelholm 2012	sen DSI Ängelholm 2012 0.79, DSI växthus 0.74, qPCR <i>P. pisi</i> 0.72, skörd Ängelholm 2012 -0.63.
Sen DSI Ängelholm 2012	Skörd Ängelholm 2012 -0.94, qPCR <i>P. pisi</i> 0.84, DSI Ängelholm 2012 0.79, skörd Ängelholm 2013 -0.79.
DSI Ängelholm 2013	qPCR <i>P. pisi</i> 0.65, skörd Ängelholm 2013 -0.3.
DSI Logården 2012	biomassa Logården 2012 -0.62, biomassa Ängelholm 2012 -0.17.
DSI Logården 2013	biomassa Logården 2012 -0.67
Biomassa Ängelholm 2012	DSI Logården 2012 -0.17
Biomassa Logården 2012	DSI Logården 2013 -0.67, DSI Logården 2012 -0.62.
Skörd Ängelholm 2012	sen DSI Ängelholm 2012 -0.94, qPCR <i>P. pisi</i> -0.76, skörd Ängelholm 2013 0.75, DSI Ängelholm 2012 -0.63.
Skörd Ängelholm 2013	sen DSI Äng 2012 -0.79, skörd Ängelholm 2012 0.75, DSI Äng 2013 -0.3*.
Skörd Logården 2012	Skörd Logården 2013 0.63
Skörd Logården 2013	Skörd Logården 2012 0.63
qPCR <i>P. pisi</i> Ängelholm 2012	Sen DSI Ängelholm 2012 0.84, skörd Ängelholm 2012 -0.76, DSI Ängelholm 2012 0.72, DSI Ängelholm 2013 0.65

* Avser korrelation på parcellnivå.

En sammanställning av alla sortskillnader presenteras i tabell 3, analyserade separat med varje försöksplats/år för sig.

Tabell 3. Skillnader mellan sorter för olika responsvariabler, analyserade separat för varje fältförsök. Inom varje kolumn är sorter som delar en bokstav ej signifikant skilda.

Sort	Fältbiomassa		Sjukdomsindex		Sent fältindex		<i>P. pisi</i> qPCR		Skörd		Fältbiomassa		Sjukdomsindex		Skörd		Sjukdomsindex		Skörd					
	2012 Äng.	2012 Äng.	2012 Äng.	2013 Äng.	2012 Äng.	2012 Äng.	2012 Äng.	2012 Äng.	2012 Äng.	2013 Äng.	2012 Log.	2012 Log.	2012 Log.	2012 Log.	2013 Log.	2013 Log.	2013 Log.	2013 Log.	2013 Log.	2013 Log.				
Tattoo	44	A	35	DE	43	DE	4	DE	1.24	ABC	1030	C	3440	AB	38	AB	34	E	2950	D	42	AB	3660	AB
Taifun	40	AB	56	ABC	54	AB	6.75	AB	3.85	A	370	D	3200	B	35	BC	45	CDE	3240	D	51	AB	5060	A
Isabell	44	A	41	CDE	40	EF	6	BC	2.31	ABC	550	D	3160	B	37	AB	40	DE	3890	BCD	44	AB	5080	A
Laura	24	C	70	A	60	A	8	A	3.43	AB	360	D	3036	B	23	E	68	A	3030	D	62	A	3380	AB
Fuego	35	B	54	ABC	59	A	5.25	CD	3.51	AB	1180	C	3330	AB	36	AB	61	AB	3410	CD	38	B	3820	AB
Oena	36	AB	50	BCD	46	BCDE	2.5	F	0.52	BC	1670	B	4190	AB	32	BC	54	BC	5890	A	35	B	5160	A
Bioro	38	AB	37	DE	32	F	2.25	F	0.51	BC	2190	A	3890	AB	31	BCD	50	BCD	4780	B	46	AB	4910	A
Gloria	34	B	32	E	44	CDE	3.25	EF	0.26	BC	1270	C	3670	AB	33	BC	39	DE	2940	D	33	B	4300	AB
Julia	35	B	28	E	37	EF	2	F	0.48	BC	2000	A	4430	A	25	DE	62	AB	4290	BC	45	AB	4670	AB
Alexia	43	AB	42	CDE	52	ABCD	2.25	F	0.09	C	2280	A	3590	AB	28	CDE	54	BC	3310	CD	43	AB	2990	B
Marcel	37	AB	60	AB	53	ABC	7.25	AB	1.7	ABC	290	D	1660	C	42	A	52	BCD	3390	CD	28	B	3880	AB

Växtföljdsförsöken och jordprover

Data för skörd och sjukdomsindex redovisades i slutrapport för projektet H0833534. Där sågs ett antal signifikanta förfruktseffekter på sjukdomsindex och skörd i den statistiska analysen av de tre försöken. De molekylära kvantifieringarna av *A. euteiches* och *P. pisi* i detta senare projekt visade också signifikanta förfruktseffekter. År 2 (2010) var mängderna *P. pisi* låga, men signifikant högre i ärt och fodervicker jämfört med icke mottagliga grödorna rödklöver och lupin, där spår av patogenen hittades. *A. euteiches* hade signifikant högre mängder i de mottagliga grödorna ärt och fodervicker jämfört med de andra, men även där hittade vi spår i de övriga grödorna (rödklöver, lupin och åkerböna) som inte anses mottagliga.

År 4 (2012) fanns det en signifikant förstärkande förfruktseffekt av både ärt och fodervicker på *P. pisi* i ärt. Mängden *P. pisi* i åkerböna var låg, och det gick inte att se förfruktseffekter, men en tendens till lägre incidens med icke mottaglig förfrukt. Ärt som förfrukt gav en signifikant förfruktseffekt på mängden *A. euteiches* i ärt år 4. År 4 hade enstaka prov av åkerböna halter av *A. euteiches* som var högre än i rödklöver och lupin, men ändå ungefär 2 tiopotenser under vad som sågs i ärt. Halterna *P. pisi* var i dessa försök lägre i åkerböna jämfört med samma sort (Gloria) i sortförsöket i Ängelholm samma år.

PCR primrar med taqmanprobe användes för detektion i jord. Vi lyckades detektera *P. pisi* i naturligt smittade jordar som lagrats en längre tid torrt i kylrum. Vi lyckades i 2 fall av 3 detektera en cell/500 mg jord via spikning med enstaka zoosporer. Tabell 4 visar en översikt av resultaten.

Tabell 4. Antal detektioner av *P. pisi* med taqmanbaserat qPCR system vid extraktioner av totalDNA från karakteriserade jordprover

Jordklassificering baserat på biotest	2 extraktioner		10 extraktioner (en jord per smittonivå)
	Antal jordar	Antal jordar med <i>P. pisi</i> detektion	Antal extraktioner med <i>P. pisi</i> detektion
Ingen smitta	3	0	-
Låg DSI=0-20	2	1	1
Medel DSI=20-40	2	0	0
Hög DSI=40-60	2	1	9
Smittofria prover spikade med celler av <i>P. pisi</i>			
1 tillförd cell	1 jord, 3 uppr.	2/3.	
10 tillförda celler	3	3	

Diskussion

Den molekylära detektions och kvantifieringsmetoden visade sig vara svårare än beräknat att utveckla, och dras med en viss teknisk variation i analysen, men den visade sig tillsammans med den föregående provbearbetningskedjan tillräckligt exakt för att kunna påvisa signifikanta skillnader mellan behandlingar i rotprov från fältförsök. Resultaten från inventeringen bekräftar att *P. pisi* är spridd i svenska odlingsområden, i och med att vi hittade den i 14% av de besökta fälten trots provtagning av endast 20 plantor per fält. Man kan spekulera i att problem med rotröta på åkerböna kommer att öka i framtiden om odlingen intensifieras.

Någon direkt koppling mellan fynden av andra rotpatogener och angreppsgrad hittades inte vilket antagligen beror på att de inte har någon allvarlig betydelse, mer än att de kan uppföras och överleva via åkerböna i växtföljden. Arterna *F. culmorum* och *F. avenaceum* är viktiga för sädesslagen i växtföljden och kan orsaka snömögel, ax- och

stråfusarioser, rot- och stråbassjukdomar. *F. avenaceum* har även hittats på frö och baljor av åkerböna och kan troligtvis orsaka sämre uppkomst. *Cylindrocarpon* spp. är en vanlig rotsjukdom och kan angripa en rad olika grödor bl a morötter, sockerbetor, potatis och röd-och vitklöver.

Resultaten från fältförsöken med olika sorter på fält med rotröta gav en mer komplex bild efter att 2012 års prover analyserats molekylärt och de samlade resultaten analyserats. Det står klart att resistens mot *P. pisi* manifesteras i fält, eftersom det fanns en tydlig korrelation mellan symptom i växthus vid inokulering med *P. pisi* i vermikulit, och symptomen i Ängelholm 2012. Symptomen i fält var i sin tur negativt korrelerade med skörden, men vi såg inget statistiskt signifikant samband mellan skörd och växthussymptom. Proverna i Logården, där vi inte detekterade *P. pisi*, hade också betydande symptom, vars mönster liknade de i Ängelholm även om korrelationen inte var statistiskt signifikant. Den svarta missfärgningen vid Phytophthora-infektion har stor betydelse för den okulära bedömningen av sjukdomsindex. Pigmentet produceras av växten som en stressreaktion, och det är rimligt att anta att olika sorter är olika benägna till detta oberoende av om stressen utlöses av *P. pisi*. Man kan därmed dra slutsatsen att sjukdomsindex i proverna från Logården orsakades av andra faktorer, t.ex andra patogener.

Mängden *P. pisi* i proverna från Ängelholm 2012 uppvisade signifikanta skillnader mellan sorter, och intressant nog en signifikant korrelation med skörden och det bedömda sena sjukdomsläget som baserades på en okulär skattning av beståndet i varje parcell. Vi tolkar resultaten som att angreppen av *P. pisi* blev starkast i Ängelholm 2012, och att de orsakade den betydande skördeminskning vi såg i det försöket jämfört med de tre andra.

Även sorter som var helt symptomfria i patogenicitetstester visade sig kunna bli angripna i fält. Resistensen har alltså betydelse, men är inte fullständig.

Resultaten från växtföljdsfältförsöken ger ytterligare ledtrådar till sjukdomens dynamik. Trots odling av åkerböna på somliga parceller i smittade fält i upp till 4 år i rad såg vi i de försöken endast små mängder *P. pisi* i rötterna av åkerböna det fjärde året, och skördarna var höga, dock högst efter rödklöver och lupin. Vi vet inte varför angreppen blev lägre i dessa tre försök jämfört med samma sort i det närbelägna Ängelholm under samma år. Ytterligare ett något oväntat resultat i samma riktning var att förekomsten av *P. pisi* i ärt stimulerades av fodervicker, men inte av åkerböna.

Våra resultat från detektion i jordprover tyder på en bild som motsvarar den vi sett för andra oomyceter, dvs att halter av inokulum som är under eller nära detektionsgränsen kan räcka för att orsaka sjukdomssymptom. Dock fick vi positiv detektion i 9 av 10 extraktioner från ett jordprov som gav höga symptom, så molekylär detektion kan möjligen vara användbar för att hitta de mest smittadefälten. Vi visade att det är möjligt att detektera enstaka celler i extraktionsmängden om 0.5 g jord, vilket visar att den tekniska detektionsförmågan är god.

Slutsatser gällande råd till näringen

Fungerar resistens mot *P. pisi* i fält? Ja, vid starka angrepp finns samband mellan mängden *P. pisi* i rötterna och skörden, liksom betydande sortskillnader.

Är *P. pisi* vanlig i svenska åkerbönfält? Ja, vi upptäckte patogenen i 14% av alla prover spridda i södra Sveriges odlingsområden, trots att endast 20 plantor per fält grävdes upp.

Går det att se ett tydliga samband mellan mottagliga grödor i växtföljden, patogenhalt i rötterna och skörd? För *A. euteiches* i ärt fanns sådana samband. För *P. pisi* i åkerböna

är det inte självklart att "dålig" växtföljd ger starka angrepp, även om vi kan se uppförökningseffekter. Men när ett angrepp kommer kan skörden påverkas starkt.

Publikationer

Två manuskript är under arbete:

Detecting *Phytophthora pisi* in field material: species-specific qPCR assays applied on soil and root samples series from Sweden.

Tolerance and resistance against root rot caused by *Phytophthora pisi* in four legume hosts.

Publicerad artikel i fackpress:

Wikström, M., Persson, L. och Heyman, F. 2013. Stora sortskillnader i rotröta i åkerbönor. *Arvensis* 4, 28-29.

Övrig resultatförmedling

Mariann Wikström presenterade projektet och fältförsöket för rådgivare och lantbrukare på Logårdens försöksgård i Grästorp vid Hushållningssällskapens Logårdsdagar 2012-07-03.

Mariann Wikström var inbjuden talare och höll ett föredrag med titeln "Rotpatogener i åkerböna och ärt" vid Hushållningssällskapens Framtidsdagar i Karlstad 2012-09-25.

Mariann Wikström var inbjuden talare och höll en presentation av projektet under ett seminarium om åkerbönor på Borgeby Fältdagar 2013-06-26.

Mariann Wikström höll ett föredrag på en fältvandring i Fjärås anordnad av Länsstyrelsen i Halland 2013-07-09. Deltagare var rådgivare och lantbrukare från västra Sverige.

Mariann Wikström var inbjuden talare och höll en presentation med titeln "Hur undviker vi rotpatogener i trindsäd? Finns det sortskillnader?" vid Jordbruksverkets FoU-dagar i Hässleholm 2015-03-04.

Referenser

Vicente Die, J., Román, B., Nadal, S., Dita, M., & González-Verdejo, C. (2009). Expression analysis of *Pisum sativum* putative defence genes during *Orobanche crenata* infection. *Crop & Pasture Science*, 60, 490–498