

## Gradering av patogenangrepp i vete med kvantitativ PCR-metodik

Projektet var en ettårig fortsättning på ”Bestämning av förekomst av patogena svampar i vete med PCR-teknik (V0648026). Resultaten från detta projekt, innefattande två år av utveckling och användning i försök, har sammanställts i en rapport från avdelning för precisionsodling ”Bestämning av förekomst av patogena svampar i vete med PCR-teknik”, Avdelningen för precisionsodling, Rapport 18, Skara 2008. Tillgänglig via länken: <http://pub-epsilon.slu.se:8080/292/>

I det tidigare projektet V0648026 utvecklades metoder för att bestämma förekomsten av tre viktiga bladpatogener i vete och de började användas för att skatta effekter av fungicider m.m. Patogenerna är *Septoria tritici* som orsakar svartpricksjuka, *Drechslera tritici-repentis* (DTR) som ger vetet bladfläcksjuka och *Stagonospora nodorum*, brunfläcksjuka. I H0760014 beviljades, med reduktion på 20 % av sökta belopp, medel för att under ytterligare ett år använda den nya mättekniken i studier av olika fungiciders effekter mot dessa bladpatogener. Vidare avsågs att följa utvecklingen av dessa patogener på några gårdar med intensiv veteodling under 2008. Under våren 2008 erbjöds också fältförsöksutförare att lämna in veteprover för analys av svampfloran från sina försök, och få svar direkt under pågående säsong. Förhoppning var att få igång en praktisk användning av den nya metodiken och öka medvetenhet om dess möjligheter, exempelvis inför utläggning av försök eller val av fungicider vid praktisk bekämpningar. Resultaten av aktiviteterna i projektet under 2008 redovisas nedan.

I ett annat pågående SLF-projekt, V0960033 ”Effektförändring hos fungicider i höstvetete och korn under svenska förhållanden”, har PCR-tekniken som tagits fram i de ovanstående projekten använts parallellt med okulära graderingar i höstvetete både 2009 och 2010. Preliminära resultat visar på en god korrelation. Detta projekt drivs av Per-Göran Andersson på Hushållningssällskapet tillsammans med Växtskyddscentralerna vid Jordbruksverket.

## Material och Metoder

### Diagnosservice

Ett provtagningsprotokoll för ”egen”-provtagning i vetefält utarbetades och distribuerades till fältförsöksutförare och försöksbeställare, bilaga 1. Eurofins Food and Agro AB fungerade som mottagare av proverna och analyserna gjordes i deras laboratorium. Rapporteringen av resultaten till testanvändarna skedde också enligt riktlinjer utarbetade i projektet, bilaga 1.

### Jämförelser av fungiciders effekt

Prover insamlades från försök i försöksserien L 15-1040 ”Olika fungiciders effekt mot DTR och Septoria i höstvetete” på försöksplatserna Linköping (Vreta kloster), Uppsala (Grillby), Skara (Håberg) och Örebro. Proven togs i leden behandlade med Comet (0,5

l/ha), Proline ( 0,4 l/ha) och Tilt Top ( 0,5 l/ha) samt i den obehandlade kontrollen. Prov togs på bladnivå 1-3 och i tre block, dvs n=3.

### **Utveckling av angrepp av bladpatogener**

För att studera utveckling av patogenerna i ett bestånd togs bladprover (n=40) på 4 bladnivåer i höstvetefält på tre gårdar i Skaraborg; Kilagården, Hästhalla och Skofteby, under veckorna 22-30 2008. Sorten var Olivin i samtliga fält. På Kilagården och Hästhalla var förfrukten höstvetete och på Skofteby havre och året innan höstvetete (förfrukt). Bladproverna hanterades enligt rutinerna i Almqvist *et al* 2008, från provtagning till analys och resultatberäkning

## **Resultat och diskussion**

### **Diagnosservice**

Totalt lämnades 12 prover in för analys under perioden med DiagnosserVICEN under maj och juni 2008, dvs innan beslut om eventuell fungicidbehandling. Analysresultatet redovisas sammanställda i den form som det svarades ut, men information om provtagningsplats är borttaget (bilaga 1).

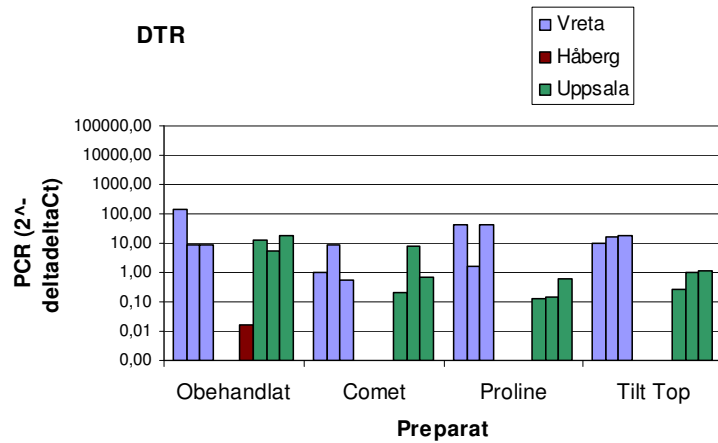
En omfattande information till försöksutförare/köpare gjorde att vi hoppades på fler prover än de 12 st som kom in, men ändå värt att notera är att 3 olika organisationer skickade in prover. Det är heller inget nytt att det tar lång tid att etablera nya rutiner. Grunden för svaren är den unika utvärderingsmall som utvecklats i det tidigare projektet. Den indelar angreppet i 5 klasser utifrån den relativa DNA-mängd  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (2DCT-värdet) av svamp i bladen. 2DCT-värdet är ett relativt värde som talar om hur mycket svampvävnad som hunnit växa till i vetebladet. Klass 4 talar om att det är relativt stora angrepp på bladen; 10-20% av bladytan är dödad av svamp. På blad i klass 3 syns tydliga svampfläckar på bladen och mängden svampvävnad är bara bråkdelar av den i klass 4. I klass 2 finns svampen i låg nivå, men baserat på undersökningar av svampens utveckling över tid kan vi anta att tillväxt sker. Klass 1 är strax över detektionsgränsen och förmodligen bara de första sporererna på bladet. Det intressanta är att tekniken öppnar iakttagande av tidig tillväxt.

### **Jämförelse av fungiciders effekt**

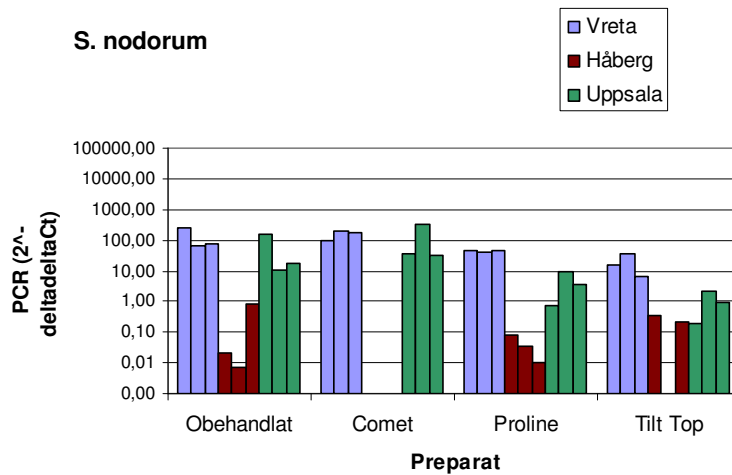
Få prover uppvisade symptom vid den okulära graderingen i början av juli i försöksmaterial från 2008. Symptom av *S. nodorum* noterades inte i något prov. Mycket låga nivåer av *S. tritici*-angrepp noterades i ett fåtal prover från Vreta och Håberg (<0,3%). Enligt den okulära graderingen fanns det endast en svag infektion av *DTR* i ett prov från Uppsala, Led A (2-3%). Data från den okulära graderingen gick därför generellt inte heller att använda för att jämföra olika fungiciders effekt på bladsvamparna eftersom nivåerna av angrepp var så låga detta år.

I figur 1-3 visas resultatet från PCR-analyserna. Samtliga patogener detekterades i prov från samtliga platser. Detta visar återigen att med PCR-analysen kan sjukdomarna upptäckas tidigt - innan symptomen blir synliga på bladen. Lägst var nivåerna i prover från Håberg och högst i prover från Vreta (gäller samtliga patogener). Till skillnad från

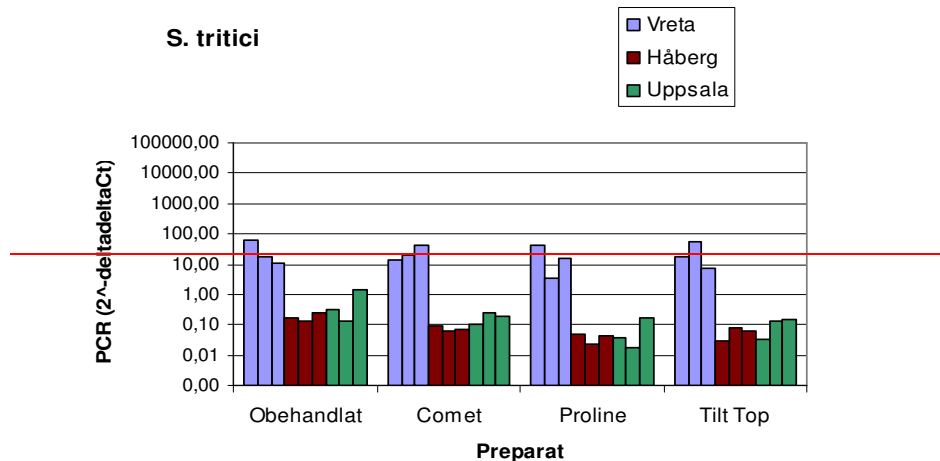
resultaten med den okulära graderingen gick det att göra en jämförelse av effekten av de olika behandlingarna. *S. tritici* har inte påverkats så mycket av fungiciderna på någon av försökplatserna, men nivån är mycket låg och det kan ha påverkat resultatet. Comet har reducerat *S. nodorum* på Håberg, men ej på de andra platserna med kraftigare angrepp. Tilt Top har hindrat utveckling på Vreta och i Uppsala och Proline har reducerat angreppet i Uppsala. DTR hämmades av alla tre i Uppsala, men inte på Vreta.



Figur 1. Resultat från jämförelse av fungicideffekt enligt PCR-analys. Figuren visar resultatet från analys av DTR. Resultat från obehandlat samt tre behandlingar visas för tre olika försöksplatser, tre upprepningar per behandling och plats



Figur 2. Resultat från jämförelse av fungicideffekt med PCR-analys. Figuren visar resultatet från analys av *S. nodorum*. Resultat från obehandlat samt tre behandlingar för tre försöksplatser tre upprepningar per behandling och plats .

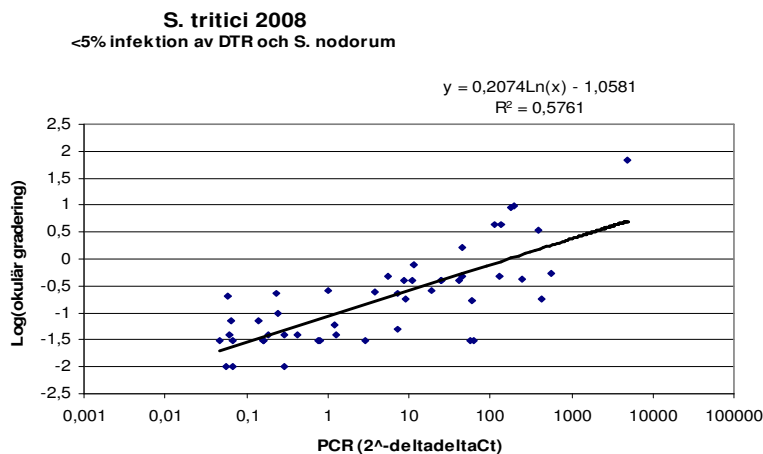


Figur 3. Resultat från jämförelse av fungicideffekt enligt PCR-analys. Figuren visar resultatet från analys av *S. tritici*. Resultat från obehandlat samt tre behandlingar på tre olika försöksplatser tre upprepningar per behandling och plats.

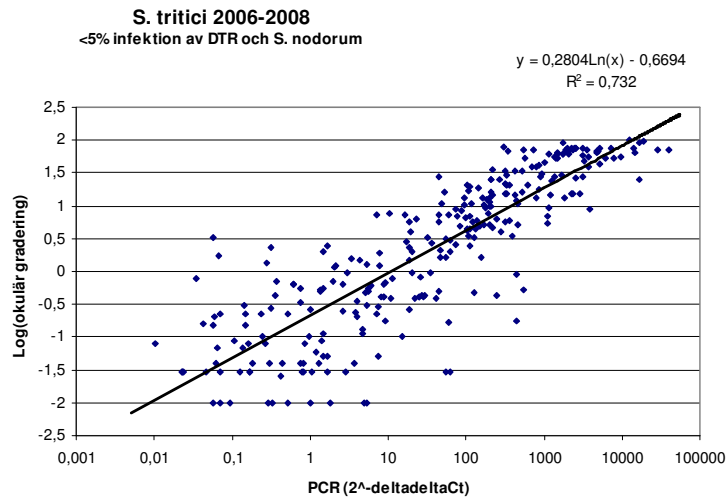
### Korrelation mellan okulär gradering och PCR

Under 2008 var svartpricksjuka den dominerande bladfläcksvampen i landet, men angreppen var på en lägre nivå än på många år. Detta berodde på att försommaren var torr och missgynnade patogenernas spridning och utveckling i höstvetebestånden.

I Figur 4 visas korrelationen mellan resultatet från den okulära graderingen av *S. tritici* och resultatet från PCR-analysen ( $R^2=0.58$ ). I figuren finns samtliga prover med <5% infektion av *DTR* och *S. nodorum* med (endast ett prov borttaget då nivåerna av *DTR* var låga detta år). I Figur 5 visas motsvarande samband för samtliga prover som analyserats under 2006-2008 ( $R^2=0.73$ ). Korrelation är något sämre om man bara ser till 2008 års prover. En förklaring till detta kan vara att angreppsnivåerna 2008 var på en relativt låg nivå jämfört med tidigare år och att det anses svårare att okulärt skatta låga angreppsnivåer.

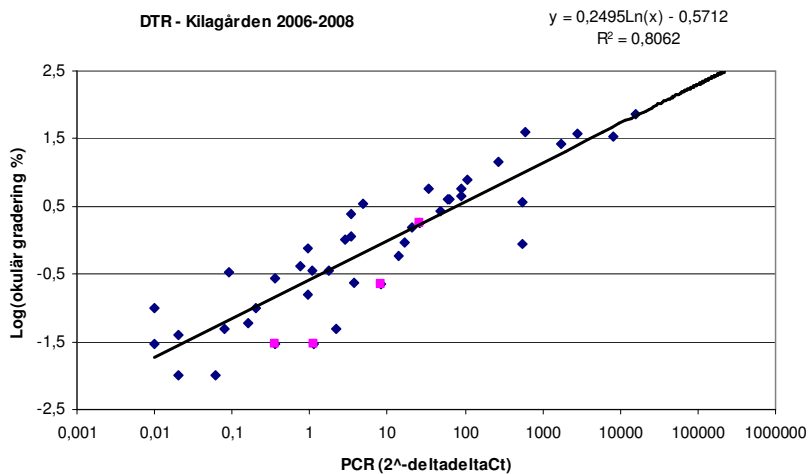


Figur 4. Korrelationen mellan okulära graderingen av *S. tritici* (infekterad bladyta i %) och realtids-PCR för prov med *S. tritici*-infektion och samtidigt max. 5% infekterad bladyta av *S. nodorum* och *DTR*. Prover från 2008.



Figur 5. Korrelationen mellan okulära graderingen av *S. tritici* (infekterad bladyta i %) och realtids-PCR för prov med *S. tritici*-infektion och samtidigt max. 5% infekterad bladyta av *S. nodorum* och *DTR*. Prover 2006-2008.

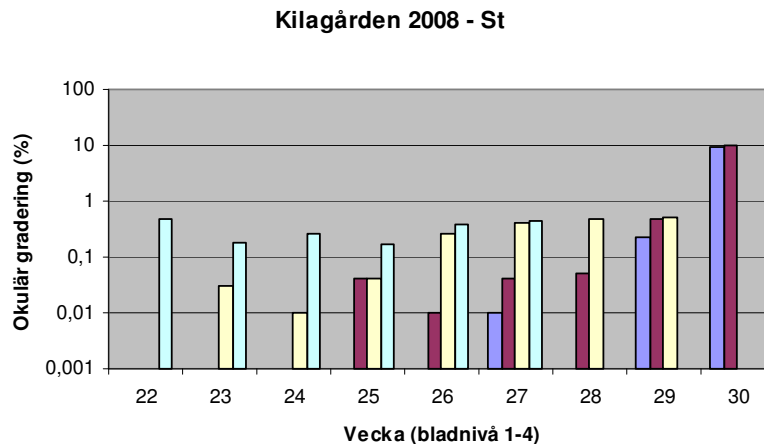
I Figur 6 visas sambanden mellan resultatet från den okulära graderingen av *DTR* och resultatet från PCR-analysen för prover från Kilagården 2006-2008 ( $R^2=0.81$ ). Figuren visar hur 2008 års resultat, se nedan, ansluter till sambandet från de två föregående åren på Kilagården.



Figur 6. Korrelationen mellan den okulära graderingen av *DTR* (infekterad bladyta i %) och realtids-PCR. Prover 2006-2008 på Kilagården. Blå: prov 2006-2007. Rosa: prov 2008.

### Kilagården - angrepp av patogener under säsongen 2008

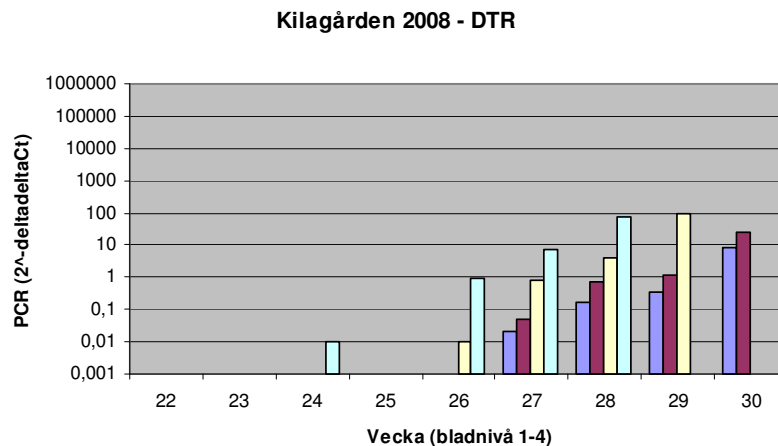
Förekomsten av de tre patogenerna följdes under en nioveckors period under säsongen 2008. Enligt den okulära graderingen förekom *S. tritici* i relativt låga, men synliga nivåer (Figur 7). Endast ett fåtal prover visade infektion av *DTR* (<2%) och *S. nodorum* noterades inte alls i den visuella graderingen.



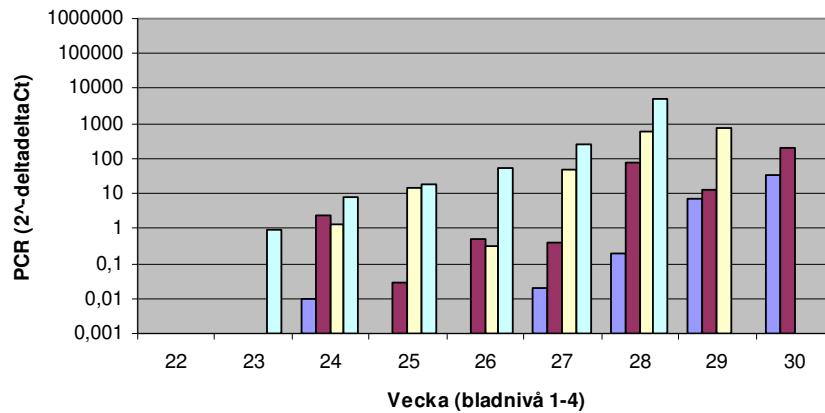
Figur 7. Okulära graderingen av *S. tritici* på Kilagården 2008. Förändringen under säsongen på olika bladnivåer.

Med PCR kunde samtliga patogener detekteras på Kilagården och förändringen kunde följas över tid (Figur 8). Detta år var nivåerna av *DTR* låga och DNA detekterades först i v 24 på bladnivå 4. I v 27 kunde denna patogen detekteras på samtliga bladnivåer. *S. nodorum* och *S. tritici* kunde detekteras tidigare än *DTR*. I v 22 kunde *S. tritici* detekteras på bladnivå 2, men symptomen var endast synliga på bladnivå 4 samma vecka. De första nivåerna av *S. nodorum* detekterades med PCR på bladnivå 4 i v 23.

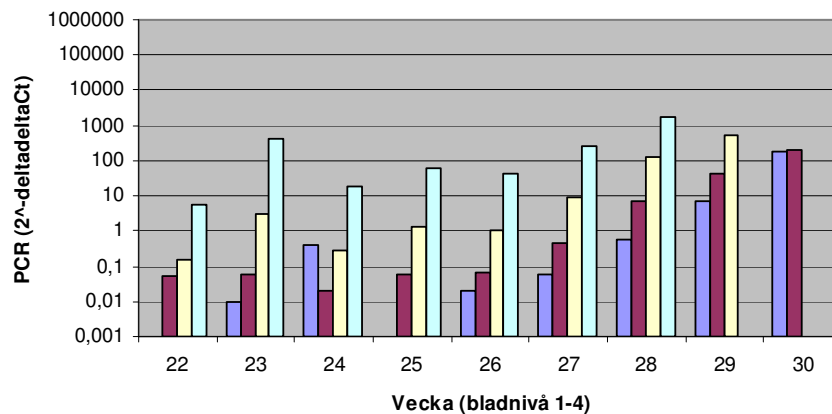
Figur 8 a. Resultatet för PCR-analys a *DTR* på Kilagården 2008. Diagrammet visar hur förändringen ser ut över säsongen på olika bladnivåer.



### Kilgården 2008 - Sn



### Kilgården 2008 - St



Figur 8 bc. Resultatet för PCR-analys av *S. tritici* (St), *S. nodorum* (Sn) på Kilgården 2008. Diagrammet visar hur förändringen ser ut över säsongen på fyra olika bladnivåer.

### Slutsatser

Resultaten från 2008 stärker tidigare års iakttagelser av att:

- PCR är ett utmärkt verktyg för att upptäcka tidiga angrepp av de tre patogenerna och följa utvecklingen av enskilda patogener under en säsong
- sambandet med okulärbesiktning är stabilt mellan år och det är något bättre vid högre angreppsgrader
- PCR-baserade bestämningar fungerar bättre än okulär besiktning när det gäller att säkert bestämma effekter av fungicider även vid låga infektionsnivåer

Helt nytt är att det gick att etablera en växtdiagnostisk service som på mindre än tre dagar efter provtagning kan ge ett relevant mått på nivån av förekomst av tre viktiga växtpatogener i ett vetebestånd. Det öppnar för en användning av analystekniken för val av försöksplatser med en lämplig svampflora och ett lämpligt patogentryck. Tekniken lämpar sig också för uppföljning av effekter av åtgärder i försöksparceller. I dessa kan representativa prov lätt tas ut via många delprover i hela parcellen.

Detta innebär att det nu finns teknik att enkelt följa upp effekterna av olika fungicider på artnivå och notera stabilitet i olika vetesorters resistens och tolerans mot angrepp.

Intressanta och viktiga framtida utvecklingsområden är att försöka reda ut:

- hur sambandet ser ut mellan 2DCT-värden och tillväxt av de olika patogenerna
- om sambandet mellan tidiga angrepp och skördeförkluster är starkare för dessa 2DCT-värden än okulär besiktning
- studera sambandet mellan 2DCT-värden och mycket kraftiga angrepp då stor andel av bladytan är död, för att definiera det intervall där PCR-metoden är lämplig att använda
- om det går att utveckla en provtagningsteknik som gör det möjligt att ställa diagnos på större fältdelar än försöksparceller, undersöka provtagning metodens känslighet och eventuella risker för att DNA sprids mellan olika blad och prover
- hur långt det går att förenkla DNA-metoderna och därmed sänka analyskostnaderna

### **Presentation av resultaten**

Resultaten från de båda projekten har presenterats i Sverige på:

- Växtskydds- och växtodlingsdagar i Linköping den 11-12 december 2007
- Regional växtodlings- och växtskyddskonferens, Uddevalla 10-11 Jan 2008
- Regional växtodlings- och växtskyddskonferens, Uddevalla 15-16 jan 2009

Internationellt har PCR-resultaten presenterats med två posters på den 9th International Congress of Plant Pathology, August 24-29, 2008, Turin, Italy.

Topic area: Molecular diagnostics for plant pathology

#### **Comparison between real-time PCR and ocular grading of wheat pathogens**

*C. Lerenius, C. Filipsson and A. Jonsson*

*Department of Soil Sciences, Div. of Precision Agriculture, SLU, P.O. Box 234, SE 53223 Skara, Sweden  
Email: anders.jonsson@mv.slu.se*

Topic area: Molecular diagnostics for plant pathology

#### **Quantitative real-time PCR - an effective tool for assessment of fungal flora in field trials**

*C. Almquist<sup>1,2</sup> and C. Filipsson<sup>1,2</sup>*

*<sup>1</sup>Department of Soil Sciences, Division of Precision Agriculture, Swedish University of Agricultural Sciences, P.O. Box 234, SE-532 23 Skara, Sweden; <sup>2</sup>Lantmännen Analycen AB, P.O. Box 905, SE-531 19, Lidköping, Sweden  
Email: charlotta.almquist@lantmannen.com*

Två manuskript kommer också att lämnas in för peer view publicering i Pest Management Sciences (1) och European Journal of Plant Pathology (2)

#### **1. Assessment of wheat leaf spot diseases in field testing of cultivars and fungicides**

*Lerenius C, Almquist C and Jonsson A ( in manuscript)*

#### **2. Quantitative real-time PCR in comparison with visual grading for assessment of fungal infection of *Septoria tritici*, *Stagonospora nodorum* and *Drechslera tritici-repentis* in winter wheat**

*A. Jonsson, Almquist C, Filipsson C and Lerenius C. ( in manuscript)*



## Bilaga 1. Instruktion för ”Diagnosservice 2008” samt analysresultat

SLF-projekt: Bestämning av bladfläckssvampar i vete

### Diagnosservice 2008

#### – snabbt svar på förekomsten av bladfläckssvampar i vete

Under v 21-24 2008 har vi möjlighet att erbjuda analys av de tre vanligaste bladpatogenerna på vete till ett kraftigt subventionerat pris. Analyserna utförs som en del inom SLF-projektet ”Gradering av patogenangrepp i vete med kvantitativ PCR-metodik” som pågår under 2008/2009. Projektet genomförs av SLU i Skara i samarbete med Jordbruksverkets växtskyddscentral i Skara och analyserna kommer att utföras på Eurofins Food/Agro Sweden AB (f.d. AnalyCen) i Lidköping.

#### Analysmetoden

Inom SLF-projektet ”Bestämning av förekomst av patogena svampar i vete med PCR-teknik” utvecklades DNA-baserade analysmetoder som kan bestämma och kvantifiera mängden av *Septoria tritici* (svartpricksjuka), *Stagonospora nodorum* (brunfläcksjuka) och *Drechslera tritici-repentis* (vetets bladfläcksjuka). Analysen bygger på bestämning av mängden av för varje svamp unika DNA-sekvenser. Mängden av patogenerna jämförs sedan med mängden vete i provet och resultatet uttrycks relativt innehållet i ett referensprov. På <http://po-mv.slu.se/> under rubriken ”Publikationer” kommer inom kort finnas mer information om metoderna, projektets resultat och hur analysresultatet kan kopplas till angreppsnivåer.

#### Provtagning

Samla in minst 20 hela blad från den eller de bladnivåer Du vill undersöka. Lämna Du in Ditt prov direkt till laboratoriet går det bra att lämna in färskt prov. Skickar Du in Ditt prov per post eller om provet av annan anledning inte kan lämnas in i nära anslutning till provtagningen skall bladen placeras i hushållspapper och läggas i ett vanligt papperskuvert.

#### Provinlämning

Inom projektet har vi möjlighet att analysera ca 100 prover under denna säsong. För vår planering är det bra om Du kan höra av Dig till oss innan eller i samband med att Du skickar in ditt prov. Det är först till kvarn som gäller och anmälan ger förtur! Kostnaden för analysen är kraftigt subventionerad till 200 kr/prov. Lämna Du in Ditt prov direkt till laboratoriet i Lidköping senast tisdag morgon kl 9 är vår målsättning att Du skall få svar inom tre arbetsdagar. Det går självklart även att skicka in prov per post. Kontakta oss för information om Eurofins andra inlämningsställen.

#### Kontakt

Kontakta Charlotta Almquist på Eurofins ([charlotta.almquist@lantmannen.com](mailto:charlotta.almquist@lantmannen.com), 0510-88725) om Du har frågor om metoden eller vill lämna in prover. Du är också välkommen att höra av Dig om Du är intresserad av analyserna även utanför detta projekt.

Har Du övriga frågor om metoden och projektet är Du också välkommen att höra av Dig till Cecilia Lerenius på Jordbruksverkets växtskyddscentral i Skara ([cecilia.lerenius@sjv.se](mailto:cecilia.lerenius@sjv.se), 0501-605862) eller Anders Jonsson på SLU i Skara ([anders.jonsson@mv.slu.se](mailto:anders.jonsson@mv.slu.se), 0511-67129).

#### Adresser

##### Eurofins Food/Agro Sweden AB

Charlotta Almquist  
Box 905  
531 19 Lidköping

Besöksadress/paket:  
Sjöhagsgatan 3  
531 40 Lidköping

---

Analysresultat							
<b>- bladfläckssvampar i vete</b>							
<b>Provinformation</b>							
Provserie:							
Provnummer	Markning	Plats/ort	Bladnivå				
1			3				
2			3				
3			3				
4			3				
5			3				
6			3				
7			3				
8			3				
9			3				
10			3				
11			2				
12			3				
<b>Resultat med preliminär klassning av infektionen</b>							
Provnummer	Svamp	Analysresultat ( $2^{DDCI}$ )	Klass 0	Klass 1	Klass 2	Klass 3	Klass 4
1	<i>S. tritici</i>	0,06			X		
	<i>S. nodorum</i>	<0,01	X				
	DTR	<0,01	X				
2	<i>S. tritici</i>	0,02		X			
	<i>S. nodorum</i>	<0,01	X				
	DTR	<0,01	X				
3	<i>S. tritici</i>	0,03		X			
	<i>S. nodorum</i>	<0,01	X				
	DTR	<0,01	X				
4	<i>S. tritici</i>	18,45				X	
	<i>S. nodorum</i>	<0,01	X				
	DTR	<0,01	X				
5	<i>S. tritici</i>	0,18			X		
	<i>S. nodorum</i>	<0,01	X				
	DTR	<0,01	X				
6	<i>S. tritici</i>	0,03		X			
	<i>S. nodorum</i>	0,13			X		
	DTR	0,01		X			
7	<i>S. tritici</i>	0,36			X		
	<i>S. nodorum</i>	0,21			X		
	DTR	0,01		X			
8	<i>S. tritici</i>	0,04		X			
	<i>S. nodorum</i>	0,09			X		
	DTR	<0,01	X				
9	<i>S. tritici</i>	0,62				X	
	<i>S. nodorum</i>	<0,01	X				
	DTR	<0,01	X				
10	<i>S. tritici</i>	0,29			X		
	<i>S. nodorum</i>	0,04		X			
	DTR	<0,01	X				
11	<i>S. tritici</i>	4,48				X	
	<i>S. nodorum</i>	<0,01	X				
	DTR	<0,01	X				
12	<i>S. tritici</i>	1,8				X	
	<i>S. nodorum</i>	0,01		X			
	DTR	<0,01	X				
Observera att värdena för analysresultatet ej kan jämföras direkt mellan svamparna.							
<b>Förklaringar</b>							
<b>Svampar</b>							
<i>S. tritici</i>	<i>Septoria tritici</i> som orsakar svartpricksjuka						
<i>S. nodorum</i>	<i>Stagonospora nodorum</i> som orsakar brunfläcksjuka						
DTR	<i>Drechslera tritici-repentis</i> som orsakar vetets bladfläcksjuka						
<b>Klassningar</b>							
Klass 0	Svampen kan inte påvisas i provet/nivån i provet är <0,01.						
Klass 1	Svampen finns i provet i låg mängd, men växer troligtvis inte. Förmodligen inga synliga symptom*.						
Klass 2	Svampen finns i provet i låg mängd och tillväxt sker troligtvis. Förmodligen inga tydliga, synliga symptom*.						
Klass 3	Tydliga angrepp av svampen.						
Klass 4	Mycket stora angrepp av svampen. Förmodligen mer än 10-20% angripen bladyta.						
* synliga symptom kan förekomma på enskilda blad i beståndet. Små förekomster av en svampart kan döljas av kraftiga symptom av en annan. Detta tycks ofta gälla <i>S. nodorum</i> .							
<b>Frågor?</b>							
Kontakta:							
Charlotta Almqvist							
<a href="mailto:charlottaalmquist@eurofins.se">charlottaalmquist@eurofins.se</a>							
0730-960733							