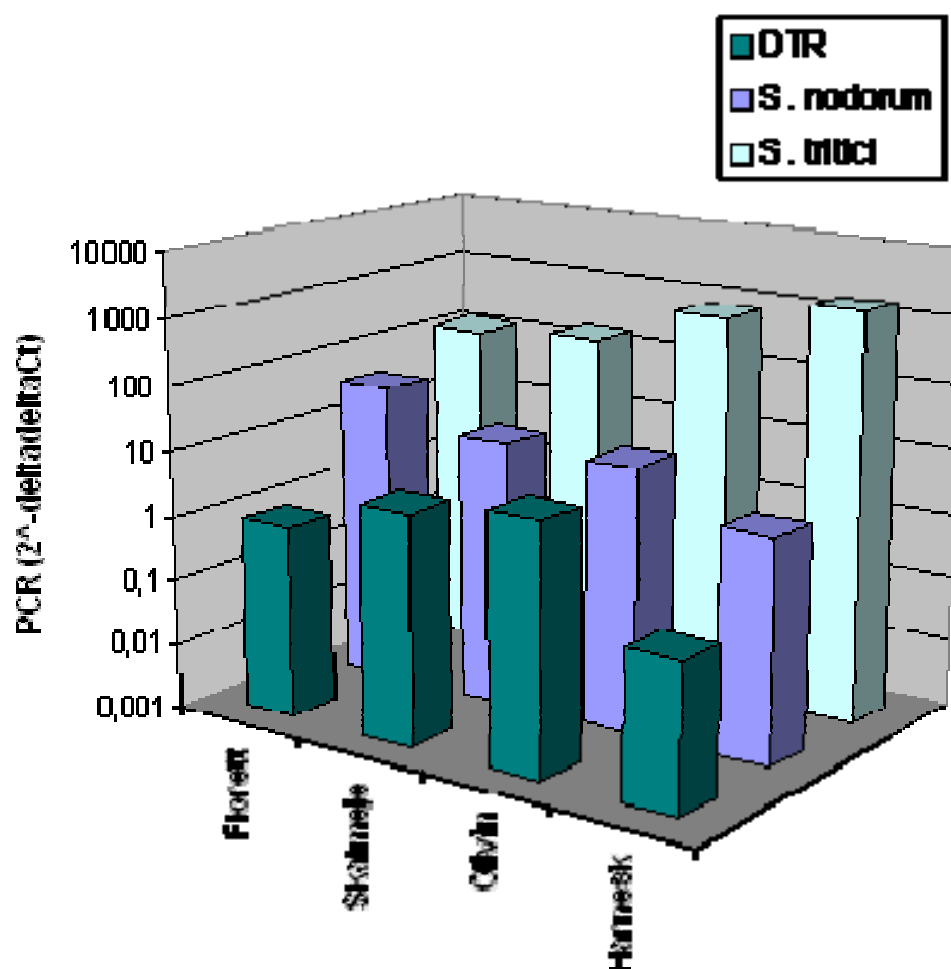


Bestämning av förekomst av patogena svampar i vete med PCR-teknik



Charlotta Almquist, Cecilia Lerenius, Caroline Filipsson och Anders Jonsson.

Avdelningen för precisionsodling

*Division of precision agriculture
Swedish University of Agricultural Sciences*

Rapport 18
Skara 2008

Report 18

ISSN 1652-2788
ISBN: 978-91-85911-51-6

Förord

Denna rapport är slutredovisningen av ett 2-årigt SLF-projekt ”Bestämning av förekomst av patogena svampar i vete med PCR-teknik” 2006-2007. Avsikten var att utveckla och använda en för svenska förhållanden helt ny metodik för bestämning av angrepp av bladfläcksvampar i vete samt att undersöka möjligheterna att komplettera och i vissa situationer ersätta de gamla okulära metoderna för bedömning av angrepp. Tanken var att ge rådgivare och försöksverksamheten och de praktiserande växtpatologerna vid Statens Jordbruksverk (SJV) ett nytt verktyg för att bättre kunna reda ut vad som händer i svenska vetefält när bladfläcksvampar angriper och lära oss hantera dem med odlingsteknik, sortval och fungicider.

Projektet var möjligt att utföra tack vare hjälp med fältarbetet från SJVs växtskyddsspecialister och deras sommarassistenter runt om i landet. Vi vill därför tacka alla kollegorna på Jordbruksverkets växtskyddscentraler för deras engagemang.

Projektet kunde genomföras tack vare att Lantmännen AnalyCen AB (numera Eurofins Food/Agro Sweden AB) låtit oss arbeta med vår PCR-utveckling i deras molekylärbiologiska laboratorium i Lidköping. Det stora antalet prover kunde vi hantera effektivt tack vare ett mycket behjälpligt bistånd av ScanBi Diagnostics AB i Alnarp. Lennart Johnsson vill vi också tacka för hjälpen med den statistiska bearbetningen. Ett stort tack riktar vi också till Eva Blixt på SLU i Uppsala för isolat av *S. nodorum*.

Ett sista tack går till VL-Stiftelsen vars initiala stöd till en förstudie 2005 av möjligheterna med PCR-teknik, gav oss en möjlighet att inleda den utveckling som lett till att metoder för bestämning av bladfläckar nu är tillgängliga för det svenska lantbruket.

Skara, maj 2008

Författarna

Innehållsförteckning

FÖRORD	1
INNEHÅLLSFÖRTECKNING	2
SAMMANFATTNING	3
SUMMARY	5
INLEDNING	6
MATERIAL OCH METODER	7
DNA-EXTRAKTION	8
REALTIDS-PCR	8
UTVÄRDERING AV RISK FÖR KONTAMINERING VID PROVHANTERING	10
REPETERBARHET OCH REPRODUCERBARHET	10
PROVTAGNING OCH KARAKTERISERING AV SVAMPFÖREKOMST I FÄLTFÖRSÖK 2006-2007	10
RESULTAT	13
JÄMFÖRELSE AV $2^{-\Delta\Delta Ct}$ MELLAN PATOGENERNA	13
UTVÄRDERING AV RISK FÖR KONTAMINERING VID PROVHANTERING	13
REPETERBARHET OCH REPRODUCERBARHET	14
SAMBANDET MELLAN OKULÄRBESTÄMNING OCH KVANTITATIV REALTIDS-PCR	15
EFFEKT AV FUNGICID PÅ PATOGENFLORAN	18
EFFEKTIV SORTVÄRDERING MED PCR-KVANTIFIERING AV PATOGENER	20
VILKA SVAMPAR FINNS I ETT FÄLT?	21
DISKUSSION	26
REFERENSER	30
BILAGA 1	32
BILAGA 2	35
BILAGA 3	37
BILAGA 4	40
BILAGA 5	42

Sammanfattning

Idag bestäms förekomsten av växtpatogener i vetet genom okulär gradering. Metoden är osäker, tidskrävande och kräver växtpatologisk kompetens. Risken är även stor för förväxling mellan olika svampsjukdomar och med andra symtom, t.ex. näringsbrister. En säker metod behövs för att kunna optimera användningen av både fungicider och sorter, men för detta krävs säkra detektions- och kvantifieringsmetoder för att kunna utvärdera i fältförsök. Även vid riskvärdering i samband med beslut om fungicidbehandling i fält behövs specifika och säkra metoder för att bestämma förekomsten (eller frånvaron) av olika svamparter i fält.

I SLF-projektet V0648026 "Bestämning av förekomst av patogena svampar i vete med PCR-teknik" har kvantitativa PCR-metoder utvecklats för att bestämma de tre svampsjukdomarna i höstvetet; svartpricksjuka (*Septoria tritici*), vetets bladfläcksjuka (*DTR*, *Drechslera tritici-repentis*) och brunfläcksjuka (*Stagonospora nodorum*). PCR, polymerase chain reaction, utnyttjar termostabila enzymer för att selektivt detektera och mångfaldiga (amplifiera) en specifik DNA-sekvens under ett antal processteg, s.k. temperaturcykler. När mängden DNA når en viss kvantitet kan den detekteras av PCR-instrumentet och innehållet i ett prov kan beräknas.

De nu tillgängliga metoderna har hög specificitet, hög reproducerbarhet och låg detektionsgräns. De har utvecklats med tanke på att bli kostnadseffektiva och möjliga att använda praktiskt omgående. Analysmetoderna möjliggör en objektiv kvantifiering av de tre bladpatogenerna i vete och har i denna studie visat sig vara mycket lämpliga att användas i samband med utvärdering av t.ex. fungicider och sorter. Robustheten i metoderna demonstreras av en mycket god korrelation mellan de två laboratoriernas resultat av bestämningar av samma prov.

Resultaten visar på en mycket god korrelation mellan okulär gradering och PCR när angrepp följs i enskilda försök. Korrelationsstudier när resultaten från alla försök de båda åren slås samman, ger också en god korrelation för *DTR* och *S. tritici*. Den förbättras ytterligare när data från provpunkter med stora angrepp av fler än en patogen tas bort ur korrelationsberäkningen ($R^2=0.75$ för *S. tritici*). Detta resultat pekar på en svaghet hos den okulära graderingen som har svårt att upptäcka blandinfektioner. I okulära graderingar rapporteras ingen förekomst av *S. nodorum*, trots att PCR-analyserna visar på en förvånande frekvent förekomst av *S. nodorum* i hela Sverige.

De nya PCR-analyserna gör det möjligt att upptäcka svampinfektion tidigare under säsongen jämfört med den okulära graderingen. Den låga detektionsgränsen verkar göra det möjligt att tidigt notera även förekomst av sporer på bladen, förmodligen innan de grott och börjat infektera. Utifrån resultaten föreslås ett praktiskt gränsvärde för tillväxt på 0.05 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Under detta gränsvärde sker troligtvis ingen tillväxt av svampen. Över gränsvärdet och upp till 0.5 för *S. tritici* och 0.1 för *DTR* sker tillväxt av svampen utan tydliga synliga symptom på bladen. För *S. nodorum* är det svårt att sätta samma typ av gränsvärde eftersom den endast vid ett fåtal fall identifierats och registrerats vid den okulära graderingen. Preliminärt sätts samma gränsvärden för *S. nodorum* som för *S. tritici*. Över gränsen på 0.5 respektive 0.1 anses angreppen av svampen som tydliga och värden över 1000 anses vara mycket stora angrepp av svampen, troligen mer än 10-20% infekterad bladyta.

Under 2006 återfanns både *S. tritici* och *DTR* i stor utsträckning på alla bladnivåer över hela landet, men under 2007 var *S. tritici* den klart dominerande och *S. nodorum* detekterades i över 89% av proverna.

Resultaten visar på signifikanta skillnader i fungicidernas effekt mot svamparna och i sorternas mottaglighet. De fungicider som studerats är Comet, Proline och Tilt och de sorter som använts är Olivin, Harnesk, Florett och Skalmeje. Resultaten av undersökningar i fungicidförsök visar att effekterna på svampfloran varierar mellan fungiciderna och att det går att upptäcka signifikanta skillnader även vid låga okulära angreppsnivåer. Detta tack vare PCR-analysens stora mätområde (0,01->10000).

De nya DNA-baserade metoderna för detektion och diagnos av bladfläckssvampar öppnar för fördjupande forskning och undersökningar inom ekologiska och biologiska frågeställningar såväl som agronomiska. Det kan gälla effekter av odlingssystem eller rena kvantifieringar av effekter av fungicidblandningar. Förhoppningsvis kommer den nya metodiken att bli praktiskt tillgänglig och användas för att bygga upp kunskap för att optimera användning av fungicider och rätt val av sorter.

Summary

Today, the quantification of leaf pathogens on wheat mainly relies on a visual inspection and estimation of the percentage of infected leaf area. However, this is both time consuming, requires skilled personnel with experience in plant pathology and may also be misleading if several pathogens are present on the same leaf or if the symptoms are concealed by abiotic factors. More reliable methods suitable for routine diagnosis are necessary to be able to better evaluate and optimise the use of fungicides and different cultivars.

In the SLF-project V0648026 “PCR based detection of plant pathogens in wheat”, quantitative real-time PCR assays were developed for detection of the three leaf pathogens in winter wheat; *Septoria tritici*, *Drechslera tritici-repentis* (DTR) and *Stagonospora nodorum*. The amount of plant pathogen DNA was determined using relative quantification and a wheat-specific gene was used as reference.

With high specificity, high reproducibility and low detection limit, the PCR methods developed enable an objective measurement of fungal infection levels in wheat. The results show a good correlation between visual grading and relative qPCR measurements. Although the visual grading did not report the presence of *S. nodorum*, this fungi was frequently detected using the qPCR assay. The results also show that qPCR can be used to study the effect of fungicides on the fungal flora with very small variation between replications. In addition, it was shown that qPCR is a useful tool for quantifying the amount of the three wheat pathogens in field trials where different cultivars are evaluated. Pre-symptomatic detection of the pathogens was possible and results show that the PCR-techniques even could be used to evaluate the presence of a few single spores.

For the future the results indicates a possibility to improve the evaluation of plant pathogens and plant production systems.

Inledning

Idag bestäms förekomsten av växtpatogener i vete genom okulär gradering. Metoden är osäker, tidskrävande och kräver växtpatologisk kompetens. Risken är även stor för förväxling mellan olika svampsjukdomar och andra symptom, t.ex. näringsbrister. En säker metod behövs för att kunna optimera användningen av både fungicider och sorter, men för detta krävs säkrare bestämningsmetoder för att kunna göra dessa utvärderingar i t.ex. fältförsöksverksamheten. Även vid riskvärdering i samband med beslut om fungicidbehandling behövs bättre möjligheter att bestämma svampförekomsten i fältet.

Syftet med projektet var att utveckla och anpassa kvantitativa PCR-metoder för att bestämma de tre svampsjukdomarna i höstvete; svartpricksjuka (*Septoria tritici*), vetets bladfläcksjuka (DTR, *Drechslera tritici-repentis*) samt brunfläcksjuka (*Stagonospora nodorum*), på ett snabbt och säkert sätt direkt på växtmaterialet.

Målsättningen med projektet var:

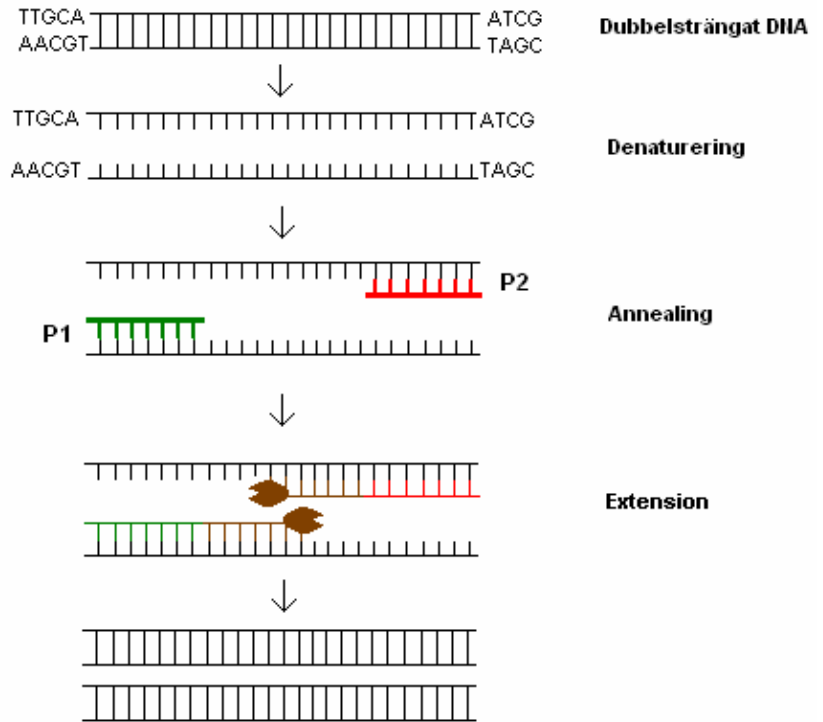
- att utveckla rutiner för en säker bestämning av förekomsten av *S. tritici*, DTR och *S. nodorum* i svenska vetefält för bedömning av fungicideffekter och lämpligt val av fungicider samt för utvärdering av andra försök, t.ex. sortförsök.
- att anpassa och utveckla DNA-baserade metoder för effektiv kvalitativ (vilka arter som finns provet) och kvantitativ (mängd av de olika arterna) PCR.
- att studera det epidemiska förloppet av bladfläcksjukdomar under fältförhållanden.
- att i befintliga fältförsök karakterisera förekommande bladfläckar både före och efter behandling med fungicider.
- att i befintliga sortförsök karakterisera förekommande bladfläckar i några olika sorter.

Utgångspunkten för projektet var att bra metoder behövs för att förbättra bestämningen av förekomsten av bladfläcksvamparna i några olika situationer:

- Fungicider har ofta olika verkningspektra och med kunskap om vilken svampart som förekommer kan en optimal fungicid väljas vid bekämpningen i enskilda fält.
- Ett bättre beslutsverktyg behövs som hjälp vid bedömningen av behovet av svampbehandling av vete. En analysteknik som tidigt kan bestämma angrepp i fältet kan bli ett viktigt komplement till övriga faktorer som nederbörd, sort, växtföljd mm.
- Fungicidförsöken kan utvärderas bättre. För närvarande har vi ofta liten möjlighet att bedöma hur olika fungicider har fungerat mot de olika svamparterna.
- Sortförsöken kan graderas och de olika sorternas motståndskraft utnyttjas i olika odlingssystem och bekämpningsstrategier anpassas efter sorten.
- Graderingar av sjukdomsangrepp i alla typer av försök (växtföljd, jordbearbetning m.m) kan förfinas och säkerställas.

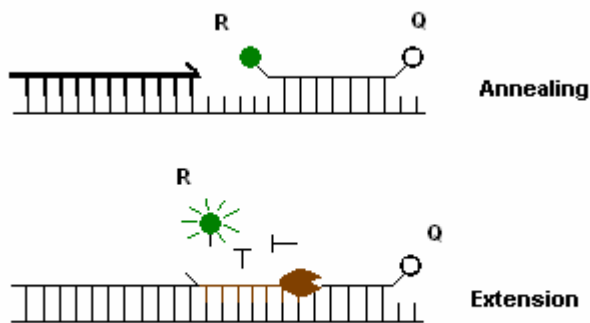
Material och metoder

PCR, polymerase chain reaction, går ut på att mångfaldiga (amplifiera) en specifik DNA-sekvens under ett antal processteg, s.k. temperaturcykler, så att mängden blir tillräckligt stor för att kunna detekteras. För att amplifiera denna målsekvens behövs s.k. primrar (P1 och P2, Figur 1) som binder in till ändarna på den specifika DNA-regionen. Ett enzym, Taq polymerase, bygger därefter upp den nya strängen. Principen för PCR och förloppet i de tre temperaturstegen visas i Figur 1.



Figur 1. Principen för PCR, polymerase chain reaction. Under det första temperatursteget denatureras det dubbelsträngade DNA't genom att strängarna delar på sig. Därefter sänks temperaturen och de s.k. primrarna (P1 och P2) kan binda in (annealing). Med hjälp av fria nukleotider (A, T, C och G) bygger enzymet sedan upp de nya komplementära strängarna. Sedan upprepas temperaturstegen i ett antal cykler och mängden av den specifika DNA-sekvensen blir så småningom tillräckligt stor för att detektera.

Fördelen med realtids-PCR jämfört med traditionell gelbaserad PCR är att målsekvensen kan detekteras i realtid med en fluorescerande prob (Figur 2). Denna prob gör det även möjligt att kvantifiera mängden DNA i provet. Under varje cykel fördubblas mängden av den specifika sekvensen och därmed ökar också fluorescensen från proben. Vid en viss punkt har fluorescensen stigit över bakgrundsbruset och överstiger ett bestämt gränsvärde. Denna punkt kallas för "cycle of threshold", Ct, och är alltså ett mått på den ursprungliga mängden av målsekvensen. Ett högt Ct-värde innebär att det tagit många fördubblingscykler för att få detektion och motsvarar alltså en liten startmängd av mål-DNA och tvärtom.



Figur 2. TaqMan-prob. Under annealingsteget binder både primrar och prob in till de separerade DNA-strängarna. TaqMan-proben är märkt med två fluorescerande molekyler (R och Q) och så länge de finns i närheten av varandra avges ingen fluorescens. Under nästa temperatursteg bygger enzymet upp de nya strängarna samtidigt som proben bryts ned. Den s.k. reportermolekylen (R) kan då fluorescera.

Baserat på tidigare metoder och senaste litteratur har metoder utvecklats och anpassats för kvantifiering av de tre växtpatogenerna (Almquist et al 2008).

DNA-extraktion

Två olika kommersiella extraktionskit (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, samt E.Z.N.A. SP Plant DNA Miniprep Kit, Omega Bio-Tek) har använts för att extrahera den totala mängden DNA från homogeniserade vetepröver med modifierade protokoll anpassade till en större provmängd. Samtliga vetepröver extraheras i två delprov för att få säkrare resultat.

Realtids-PCR

Ett lämpligt primer/prob-set specifikt för *S. tritici* fanns publicerat i litteraturen (Fraaije et al. 2002) och amplifierar en sekvens på 105 baspar i genen för cytochrome b. Primrar och prober specifika för *DTR* och *S. nodorum* har designats baserat på sekvensinformation i två patent (US patent 5585238 och 6358680). Dessa primerpar amplifierar sekvenser på 62 respektive 65 baspar i det ribosomala DNA't (de s.k. ITS-regionerna) för respektive patogen. För att kunna göra en kvantifiering av mängden patogen måste resultatet från PCR-analysen relateras till en känd mängd med hjälp av standardkurva eller normaliseras mot en referensgen och relateras till ett kontrollprov (relativ kvantifiering). Eftersom relativ kvantifiering i många fall är betydligt enklare valdes detta alternativ. Mängden patogen-DNA normaliseras därför till mängden av en gen specifik för vete (*T. aestivum*). Metoden för detektion av vete finns presenterad i litteraturen (Iida et al. 2005) och detta primer/prob-set amplifierar en sekvens på 102 baspar i vetets *waxy-D1* gen. Samtliga primer- och probsekvenser visas i Tabell 1. Specificiteten för samtliga primrar och prober har undersökts teoretiskt i sekvensdatabaser och experimentellt genom specificitetsanalys av ett antal andra växtpatogener, se Tabell 2.

Tabell 1. Primer- och probsekvenser använda för att detektera de tre svamparterna samt vete. Proberna för patogenerna märktes med FAM och TAMRA. Proben för vete märktes med TET och TAMRA.

Primer/ prob	Sekvens	Amplikon- längd	Genomiskt ursprung
STF ^a	5'-ACA TTA ACA TGA ACA ATC GGT ACT ATA ATA CTA G-3'	105 bp	Cytochrome b gen
STR ^a	5'-TGT TGC TCC TCA TAA AGA CAT TTG A-3'		
STP ^a	5'-ACA TAC CCT AAG AAT GCG GTT GCC ATC A -3'		
SNF ^b	5'-TGG CAG CCA GTG TTT TGG TA -3'	65 bp	Ribosomal RNA gen
SNR ^b	5'-GGA CGC AAG TGT TTG TTA CGA A -3'		
SNP ^b	5'-TGA AGC GCA GCA CAA GTC GCG -3'		
DTRF ^c	5'-TTG GCA GCC GGC CTA CT -3'	62 bp	Ribosomal RNA gen
DTRR ^c	5'-CCG CGG CTG GAC AAG A -3'		
DTRP ^c	5'-TTT CGG AGC GCA GCA CAT TAT TTG C-3'		
WF ^d	5'-GTC GCA GGA ACA GAG GTG T-3'	102 bp	Waxy D1 gen
WR ^d	5'-GGT GTT CCT CCA TTG CGA AA-3'		
WP ^d	5'-CAA GGC GGC CGA AAT AGG TTG CC-3'		

^a: *Septoria tritici*. ^b: *Stagonospora nodorum*. ^c: *Drechslera tritici-repentis*. ^d: Vete (*Triticum aestivum*).

Tabell 2. Svampisolat använda i studien samt specificitet hos de använda primer/prob-paren

Art och ursprung			<i>S. tritici</i> primers/prob	<i>S. nodorum</i> primers/prob	DTR primers/prob
<i>Drechslera tritici-repentis</i> CBS 265.80	Quack grass	Germany	-	-	+
<i>Septoria tritici</i> CBS 292.69	Wheat	Germany	+	-	-
<i>Stagonospora nodorum</i> Vadstena		Sweden	-	+	-
<i>Stagonospora nodorum</i> Uppsala		Sweden	-	+	-
<i>Stagonospora nodorum</i> SE 12 Skofteby		Sweden	-	+	-
<i>Stagonospora nodorum</i> SE 50 Skofteby		Sweden	-	+	-
<i>Stagonospora nodorum</i> SE 49 Skofteby		Sweden	-	+	-
<i>Stagonospora nodorum</i> SE 44		Sweden	-	+	-
<i>Stagonospora avenae</i> CBS 516.74	Wheat	Brazil	-	-	-
<i>Stagonospora avenae</i> CBS 288.69	Oat	Germany	-	-	-
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> CBS 186.65	Wheat	Germany	-	-	-
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>avenae</i> CBS 187.65	Oat	Netherlands	-	-	-
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>graminis</i> CBS 387.81	Tufted hairgrass	UK	-	-	-
<i>Aphanomyces euteiches</i> SE 5	Pea	Sweden	-	-	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (apothecia)	Soil	Sweden	-	-	-

För att bestämma mängden patogen i proven användes relativ kvantifiering och den sk. ”Comparative cycle of threshold method”. Enligt denna metod normaliserar man mängden patogen mot mängden av en referensgen [1], i detta fallet en vetegen, och relaterar sedan mängden till ett kontrollprov [2] enligt:

$$[1] \quad \begin{aligned} \Delta Ct_{\text{prov}} &= Ct_{\text{prov,patogen}} - Ct_{\text{prov,vete}} \\ \Delta Ct_{\text{kontroll}} &= Ct_{\text{kontroll,patogen}} - Ct_{\text{kontroll,vete}} \end{aligned}$$

$$[2] \quad \Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{prov}} - \Delta Ct_{\text{kontroll}}$$

Mängden i det okända provet i förhållande till mängden i kontrollprovet ges sedan av:

$$[3] \quad 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

Kontrollproven för de tre patogenerna och för vetet utgörs i detta fall av DNA-extrakt från renkulturer respektive friskt vete. Denna typ av kvantifiering ger resultatet för ett okänt prov som N antal gånger så mycket patogen jämfört med kontrollprovet. Är värdet på $2^{-\Delta \Delta Ct}$ till exempel 100 (N=100) för DTR betyder det att det finns 100 gånger så mycket DTR i provet jämfört med kontrollprovet. Eftersom mängden av de olika patogenerna i kontrollproven skiljer sig något åt och eftersom sekvenserna som detekteras av respektive patogen finns i olika antal kopior per cell kan resultatet för samtliga tre patogener inte direkt jämföras med varandra.

För att på ett bra sätt kunna jämföra de relativa $2^{-\Delta \Delta Ct}$ -värdena för de tre olika patogenerna med varandra krävs att innehållet i kontrollproven är känt samt att kunskap om patogenernas genomstorlek finns tillgängligt. BROAD Institute of Harvard and MIT har i projekten ”*Stagonospora nodorum* sequencing project” och ”*Pyrenophora tritici-repentis* sequencing project” kommit fram till att *S. nodorum*s genomstorlek kan uppskattas till 37.1 Mb och att *DTR*s genomstorlek kan uppskattas till 37.8Mb (www.broad.mit.edu). Enligt Kema et al. (2007) är *S. tritici*s genomstorlek 39.6 Mb. Med hjälp av denna information kan man beräkna hur många genom kontrollproven innehåller och sedan justera $2^{-\Delta \Delta Ct}$ -värdena med denna faktor för att få värden som även är möjliga att jämföra mellan svamparna. Antal genom i den mängd kontrollprov som analyseras vid varje körning kan beräknas med följande formel:

$$[4] \quad \text{Antal genom} = (X \cdot \text{Avogadros konstant}) / (k \cdot Y)$$

där X är mängden genomiskt DNA i kontrollprovet i gram, k är medelvikten för ett baspar i gram/mol och Y är genomstorleken i antal baser. Mängden DNA i de olika kontrollproven kan mätas spektrofotometriskt.

Utvärdering av risk för kontaminering vid provhantering

Detta försök syftade till att undersöka om torkningsprocessen av olika höstveteprover med sjukdomssymptom har betydelse för den relativa kvantifieringen av växtpatogener med realtids-PCR. Frågeställningen var huruvida det är risk för korskontamination då de olika proven torkas i perforerade påsar som ej ligger väl separerade ifrån varandra. Därför analyserades följande fyra veteprover:

1. Höstvete från Hästhalla med symptom av svartpricksjuka (*S. tritici*)
2. Höstvete från Hästhalla, utan symptom
3. Höstvete från Kilagården med symptom av svartpricksjuka (*S. tritici*)
4. Höstvete från Kilagården med symptom av bladfläcksjuka (DTR)

Av varje veteprov togs fyra delprov ut som torkades på två helt skilda platser i (1) ej separerade påsar och (2) väl separerade påsar. Två DNA-extraktioner gjordes sedan från varje delprov.

Repetierbarhet och reproducerbarhet

Metodernas repeterbarhet undersöktes genom att 10 delprov av ett och samma prov extraherades och analyserades vid ett tillfälle. Reproducerbarheten studerades genom att 14 prov extraherades med de två olika extraktionskiten och analyserades på två olika laboratorier.

Provtagning och karakterisering av svampförekomst i fältförsök 2006-2007

Prover har under säsongen 2006 och 2007 tagits ut av SJV:s personal under ledning av Cecilia Lerenius. Prover har tagits i södra och mellersta Sverige, dels i befintliga fältförsök (fungicid- och sortförsök) och dels i observationsrutor i höstvetefält som ingår i prognosverksamheten och som inte behandlas med fungicider eller insekticider. I varje parcell/observationsruta plockades slumpvis 30-80 blad. Prover togs på olika bladnivåer (bladnivå 1 = flaggbladet). Utvecklingsstadium på grödan bestämdes enligt Zadok et al. (1974). På hälften av bladen graderades svampangrepp okulärt medan hälften av bladen sparades för PCR-analys. Dessa prover stoppades omedelbart i perforerade plastpåsar och torkades. Proverna förvarades sedan svalt fram till provberedning och PCR-analys. Den okulära graderingen gjordes av SJV:s personal enligt den metod som används i försöksverksamheten (EPPO, 2004). Angripen bladyta (%) bestämdes för varje svampsjukdom på respektive blad. Bladen delades in i sju klasser, 1: 0 % angripen bladyta; 2: 0,1-1 %; 3: 1-5 %; 4: 5-10 %; 5: 10-25 %; 6: 25-50 % och 7: 50-100 %. En genomsnittlig angripen bladyta räknades fram enligt:

$$\frac{(0,5 \times \text{antal blad klass 2} + 3 \times \text{antal blad klass 3} + 7,5 \times \text{antal blad klass 4} + 17,5 \times \text{antal blad klass 5} + 37,5 \times \text{antal blad klass 6} + 75 \times \text{antal blad klass 7})}{\text{Totala antalet graderade blad}}$$

Även angrepp av andra svampsjukdomar (rost, mjöldagg) och fysiologiska fläckar noterades.

Tabell 3 och 4 visar var provtagningen gjorts 2006 och tabell 5, 6 och 7 visar provtagningen 2007. Av dessa prover valdes sedan närmare 400 prover ut för analys med realtids-PCR.

I fungicidförsöken provtogs dels obehandlade led i samband med axgångsbehandling och dels obehandlade och behandlade led cirka tre veckor senare. År 2006 användes L15-1011 i Skåne, L15-1020 i Kalmar samt L15-1040 och L15-1041 i Mellansverige. Prover togs, förutom i obehandlade led, i 2-4 olika fungicidbehandlade led i varje försök. År 2007 togs proverna i två försöksserier där rena preparat jämfördes med varandra (L15-1011 södra Sverige, L15-1040 i Mellansverige). Detta år togs prover i obehandlat samt led behandlade med Comet, Proline och Tilt.

I sortförsöken provtogs år 2007 sorterna SW Harnesk, Mon Olivin, PBIS Florett och LP Skalmjeje. Försöken var L7-105 i Skåne och L7-101 i Västergötland och Östergötland. Provtagningen gjordes vid ett tillfälle, ca 3 veckor efter axgång. I observationsrutor i 9 (2006) respektive 6 (2007) fält i Västergötland gjordes provtagningar varje vecka under totalt sju veckor.

Tabell 3. Provtagning i fungicidförsök i Skara, Linköping, Kalmar, Uppsala och Alnarp under v 25 samt v 28 2006. Sammanlagt togs 240 prover från dessa platser. Prover tagna i Skara visas även i tabell 4.

	Försöksplats	Provtagning v25 DC 57-65 Blad 1-4 Obehandlade led	Provtagning v28 DC 75-85 Blad 1-3 Behandlade och obehandlade led	Försöksplan
Skara	Helleberg	4	15	L15-1040
	Hästhalla	4	9	L15-1041
	Gustafsgården	4	9	L15-1041
	Flo	4	15	L15-1040
Linköping	Forsa	4	9	L15-1041
	Glyttingen	4	9	L15-1041
	Klostergården	4	15	L15-1040
Kalmar	Vallby	4	9	L15-1020
	Mörby långa	4	9	L15-1020
Uppsala	St. Bärby	4	15	L15-1040
	L.a Vallskog	4	15	L15-1041
	Haga	4	15	L15-1040
Alnarp	Vallåkra	4	12	L15-1011
	St. Herrestad	4	12	L15-1011
	St. Uppåkra	4	12	L15-1011
SUMMA		60	180	

Tabell 4. Utveckling av bladfläcksvampar våren 2006 samt fungicidförsök. Provtagning i obehandlade observationsrutor på gårdar i Västergötland v 23-29, de översta 2-4 bladen beroende på utvecklingsstadium. Sammanlagt togs 243 prover från 9 platser.

Gård	Sort	v 23 DC 37	v 24 DC 45-51	v 25 DC 59-65	v 26 DC 63-75	v 27 DC 75-77	v 28 DC 77 Behandl. och obehandl. led	v 29 DC 80-83
Kilagården	Olivin	4	4	4	3	3	3	2
Helleberg	Olivin	4	4	4	3	3	15	2
Hästhalla	Olivin	4	4	4	3	3	9	2
Horshaga	Olivin	4	4	4	3	3	3	2
Gustafsgården	Harnesk	4	4	4	3	3	9	2
Storegården	Harnesk	4	4	4	3	3	3	2
Flo	Harnesk	4	4	4	3	3	15	2
Nolebo	Harnesk	4	4	4	3	3	3	2
Skofteby	Harnesk	4	4	4	3	3	3	2
SUMMA		36	36	36	27	27	63	18

Tabell 5. Fungicidförsök 2007. Provtagning på gårdar i Linköping, Uppsala, Skara, Kalmar och Alnarp. Sammanlagt togs 164 prover från dessa platser.

	Försöksplats	Provtagning juni DC 47-71 Blad 1-4 Obehandlade led	Provtagning juli DC 77-83 Blad 1-2, 3 block Behandlade och obehandlade led	Försöksplan
Linköping	Vreta	4	24	L15-1040
Uppsala	Vattholma	4	24	L15-1040
Skara	Rallatorp	4	24	L15-1040
Kalmar	Vallby	4	24	L15-1011
Alnarp	Hjärup	4	24	L15-1011
	Bodarp	4	24	L15-1011
SUMMA		20	144	

Tabell 6. Sortförsök. Provtagna sorter; Harnesk, Olivin, Skalmeye och Florett. Provtagning på gårdar i Linköping, Alnarp och Skara 2007. Sammanlagt togs 96 prover från dessa platser.

	Försöksplats	Provtagning juli, DC 83-85 Blad 1-2, 2 block Fyra olika sorter	Försöksplan
Linköping	Kölbäck	16	L7-101
	Glyttinge	16	L7-101
Alnarp	Knästorp	16	L7-105
	Vallåkra	16	L7-105
Skara	Russelbacka	16	L7-101
	Kampetorp	16	L7-101
SUMMA		96	

Tabell 7. Utveckling av bladfläcksvampar våren 2007. Provtagning i obehandlade observationsrutor på gårdar i Västergötland v 21-27, de översta 2-4 bladen beroende på utvecklingsstadium. Sammanlagt togs 144 prover från 6 platser.

Gård	Sort	v 21	v 22	v 23	v 24	v 25	v 26	v 27
		DC 37	DC 41	DC 47	DC 59-65	DC 71-73	DC 77	DC 75-83
Vinköl	Harnesk	4	4	4	4	3	3	2
Håberg	Olivin	4	4	4	4	3	3	2
Kilagården	Olivin	4	4	4	4	3	3	2
Rallatorp	Harnesk	4	4	4	4	3	3	2
Ruta kvarn	Olivin	4	4	4	4	3	3	2
Bränneberg	Harnesk	4	4	4	4	3	3	2
SUMMA		24	24	24	24	18	18	12

Resultat

Jämförelse av $2^{-\Delta\Delta Ct}$ mellan patogenerna

Som tidigare nämnts går det inte göra en direkt jämförelse av $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -värden mellan de tre olika patogenerna eftersom mängden av de olika patogenerna i kontrollproven skiljer sig något åt. Genom att mäta totala DNA-mängden i kontrollproven spektrofotometriskt och utnyttja uppgifter om patogenernas genomstorlek går det att beräkna faktorer baserade på antal genom i kontrollproven som kan användas för att justera $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -värdena och på så sätt få en jämförelse mellan patogenerna. Genomstorlekarna för *S. tritici*, *S. nodorum* och *DTR* har uppskattats till 39.6 Mb, 37.1 Mb respektive 37.8 Mb (Kema et al. 2007, Broad Institute of Harvard and MIT). Mängden i kontrollproven har för ett flertal prov mätts spektrofotometriskt på genomiska DNA-extrakt extraherade direkt från mycel från agar vid minst två olika tillfällen och därefter har antal genom i kontrollerna beräknats med hjälp av ekvation [4] utifrån korrekt spädning av proven (spädning som gett samma Ct-värde för samtliga prov). Eftersom mängden har varierat något har ett medelvärde sedan beräknats (Tabell 8). Genom att dividera $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -värdet för en patogen med dess respektive värde för kontrollen i tabellen nedan blir resultatet även jämförbart mellan olika patogener. Vad man måste tänka på är att samma antal genom (och antal celler) av olika patogener inte behöver innebära samma nivå av angrepp. Självklart kan man använda $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -värden för att jämföra nivåer i olika prov för en och samma patogen utan att göra denna omräkning.

Tabell 8. Antal genom i kontrollproverna.

Patogen	Antal genom ¹	Medel ²	Patogen	Antal genom ¹	Medel ²
<i>S. tritici</i>	23,2	25,0	<i>DTR</i>	106,2	97,6
	20,3			92,5	
	18,4			110,3	
	29,0			84,2	
	31,2			94,7	
	28,2				
<i>S. nodorum</i>	25,1	32,4			
	31,2				
	31,0				
	44,1				
	31,0				

¹: Antal genom i den mängd av kontrollprovet som laddas vid varje PCR-körning.

²: Medelvärde av antal genom i kontrollen, som kan användas för att justera $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -värdet för att kunna jämföra nivåer mellan patogener.

Utvärdering av risk för kontaminering vid provhantering

Resultatet från den kontamineringsstudie som utfördes för att se huruvida provhanteringen i samband med provtagning och torkning av blad innebär någon kontamineringsrisk, visade tydligt att ingen sådan risk föreligger (Tabell 9). Det var ingen tydlig skillnad i resultat för proverna som hanterats på två olika sätt och heller ingen trend att prover med låg smitta som förvarats nära prover med hög smitta skulle resultera i ett högre värde med PCR. Att några av proverna har en ganska hög relativ standardavvikelse beror dels på att det är en förhållandevis låg nivå av svamparna i proverna samt att extraktion och analys utförts vid två separata tillfällen.

Tabell 9. Kontamineringsstudie. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -värden för samtliga tre patogener för fyra olika prover som förvarats på två olika sätt. Resultatet visas i form av medelvärden för fyra olika delprov (n=4) analyserade i ett replikat. Den relativa standardavvikelsen visas inom parentes.

Prov	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Ej separerade påsar			$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Väl separerade påsar		
	DTR	<i>S. nodorum</i>	<i>S. tritici</i>	DTR	<i>S. nodorum</i>	<i>S. tritici</i>
1	0.08 (5%)	0.64 (31%)	87.48 (65%)	0.02 (33%)	0.84 (92%)	56.25 (8%)
2	0.00	0.01 (44%)	0.35 (24%)	0.00	0.01 (29%)	0.35 (12%)
3	0.33 (100%)	0.03 (81%)	37.46 (29%)	0.15 (43%)	0.00	159.64 (55%)
4	5.24 (17%)	0.57 (58%)	23.90 (45%)	13.26 (22%)	0.75 (10%)	22.85 (32%)

¹: Höstvetete från Hästhalla med symptom av svartpricksjuka (*S. tritici*); ²: Höstvetete från Hästhalla, friskt; ³: Höstvetete från Kilagården med symptom av svartpricksjuka (*S. tritici*); ⁴: Höstvetete från Kilagården med symptom av bladfläcksjuka (DTR).

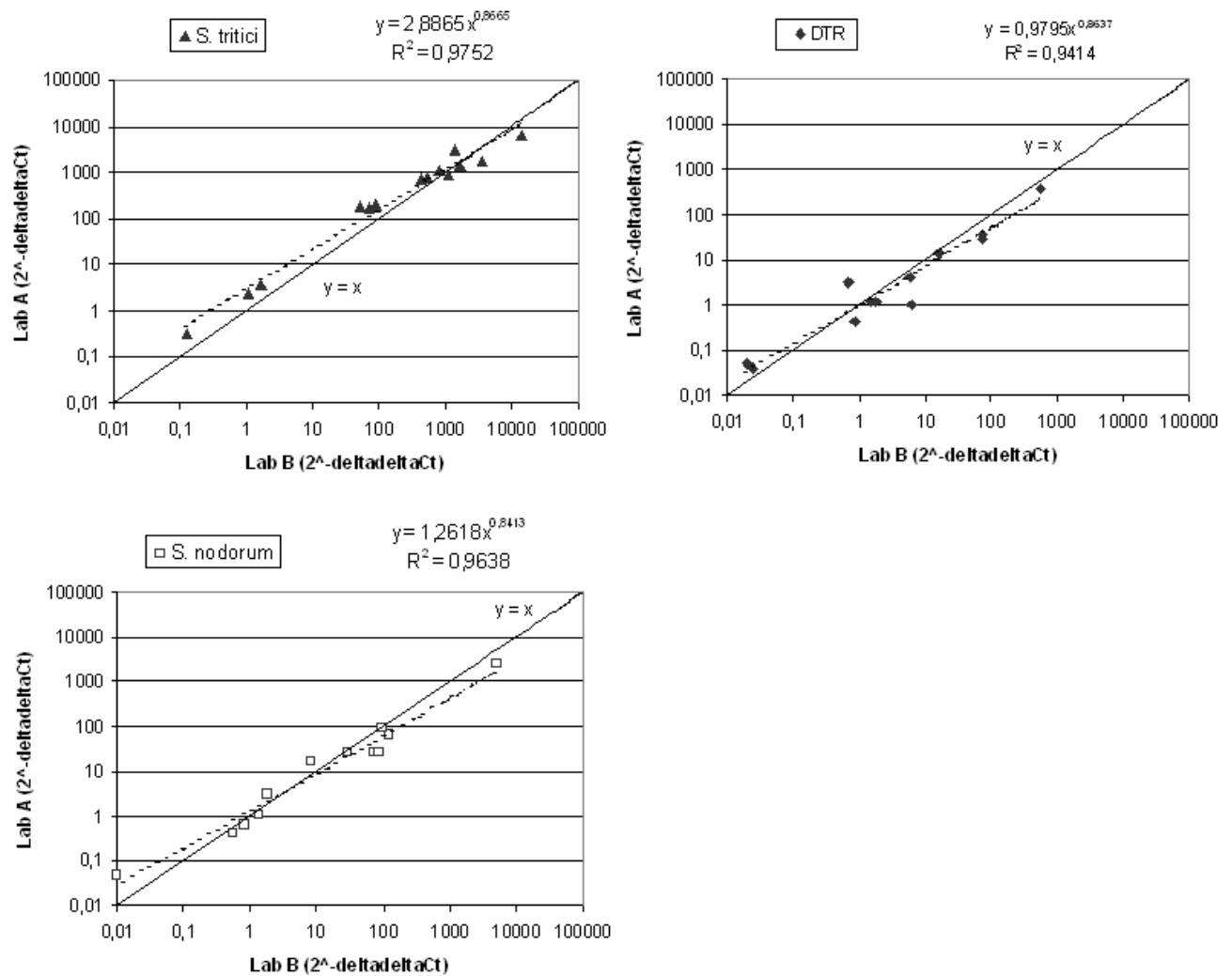
Repeterbarhet och reproducerbarhet

Resultatet från analysen av 10 delprov av ett och samma prov visar på liten variation mellan delproven (Tabell 10). Ser man dessutom till standardavvikelsen för medelvärdet då n=2 blir resultatet som förväntat ännu bättre. Samtliga prov som analyserats i detta projekt har redovisats som ett medelvärde för två invägningar.

Tabell 10. Metodernas repeterbarhet. 10 st delprov av ett och samma prov extraherades och analyserades vid ett tillfälle. Resultatet visas i form av $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -värden. Både provens standardavvikelse (SD – standard deviation) och standardavvikelsen för medelvärdet då n=2 (SEM – standard error of the mean) visas i tabellen.

Prov	<i>S. tritici</i>	<i>S. nodorum</i>	DTR
1	13,36	7,49	24,00
2	14,03	9,82	33,71
3	20,32	8,94	37,01
4	16,45	11,88	31,78
5	15,08	8,91	30,80
6	13,98	6,48	27,19
7	12,42	8,06	28,64
8	16,34	7,70	28,64
9	15,83	10,45	30,38
10	16,22	14,52	31,78
Medel	15,4	9,4	30,4
SD	2,2	2,4	3,6
Relativ SD	14,4%	25,3%	11,8%
SEM	1,6	1,7	2,5
Relativ SEM	10,2%	17,9%	8,4%

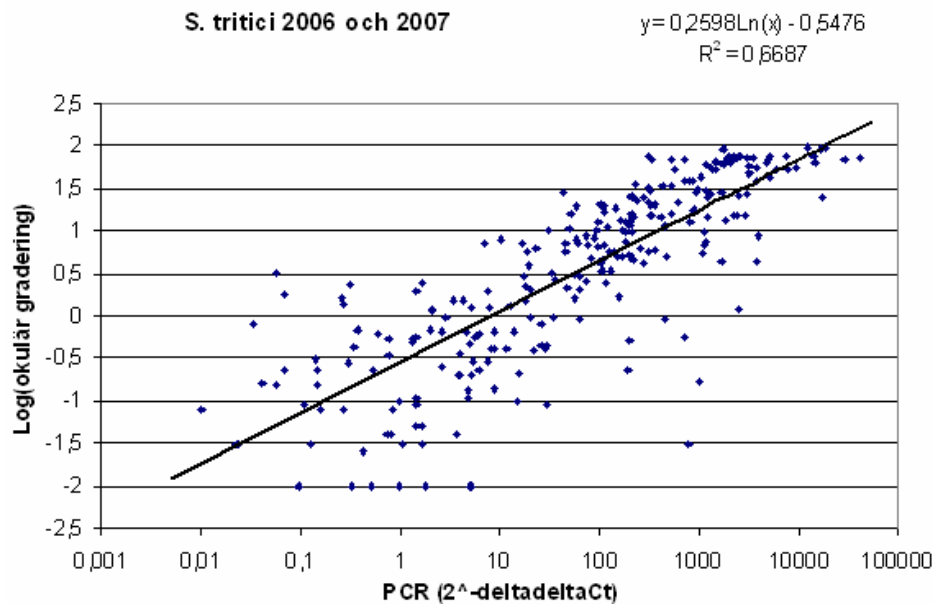
Även metodernas reproducerbarhet undersöktes genom att jämföra två laboratoriers resultat från extraktion och analys av 14 prover. Resultatet visar på mycket liten variation mellan extraktionsmetoderna och laboratoriernas analyser, vilket visas i Figur 3.



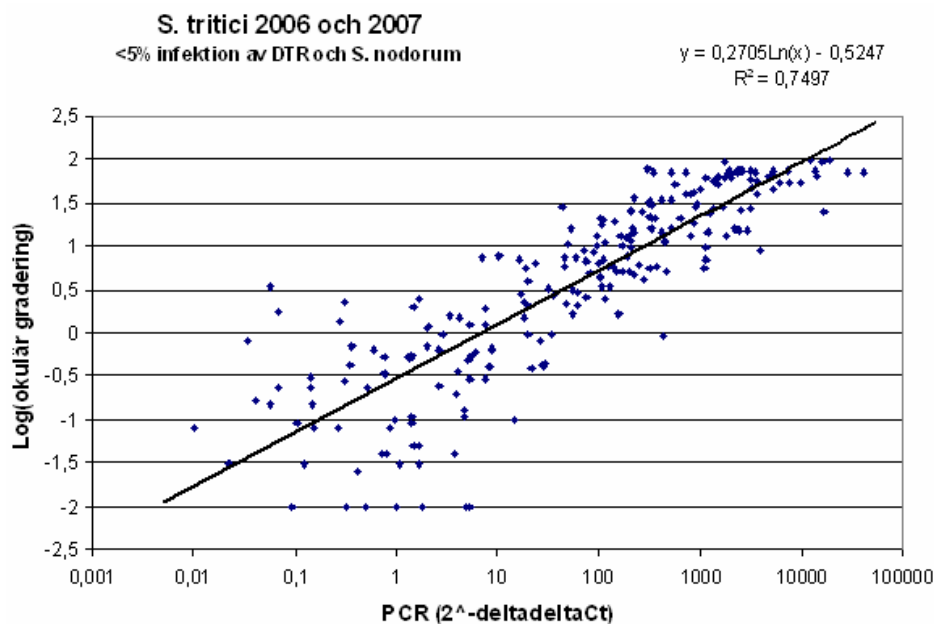
Figur 3. Metodernas reproducerbarhet. 14 olika prov extraherades och analyserades på två olika laboratorier, Lab A och Lab B. Resultatet visas i tre olika diagram för de tre patogenerna. I diagrammen visas även en linje för $y=x$ (heldragen linje).

Sambandet mellan okulärbestämning och kvantitativ realtids-PCR

I Figur 4 redovisas sambandet mellan resultatet från PCR-analysen och graderingar av prov som ansågs ha graderbara angrepp av *S. tritici*. Graderingar har gjorts vid flera tillfällen av olika personer under 2006 och 2007. Även PCR-analyserna har utförts av olika personer på två olika laboratorier. Värdet på PCR-analysen ges i form av $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Detta värde motsvarar hur många gånger skillnad det är i det okända provet jämfört med ett kontrollprov med känt innehåll av patogenen.

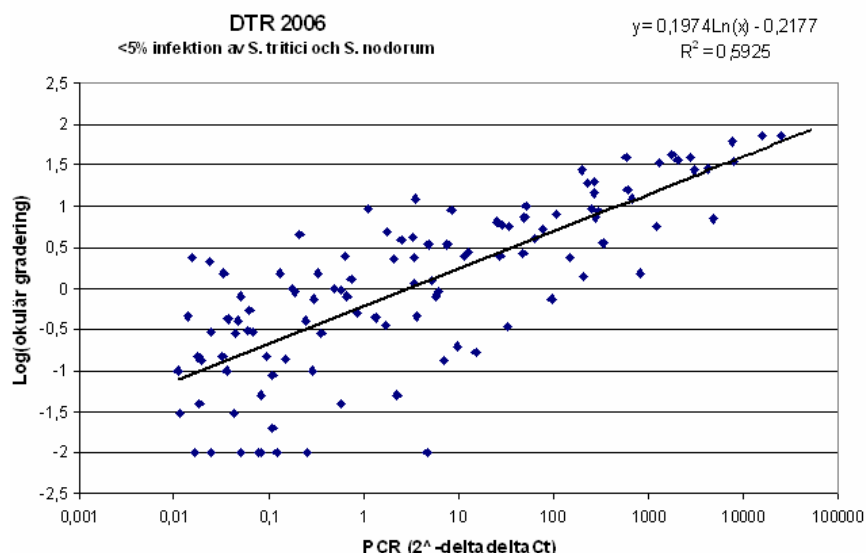


Figur 4. Diagrammet visar korrelationen mellan resultatet från den okulära graderingen av *S. tritici* (infekterad bladyta i %) samt resultatet från analysen med realtids-PCR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) för samtliga prover med infektion av *S. tritici* under 2006 och 2007. Värdena för den okulära graderingen visas logaritmerade, t.ex. motsvarar värdet 1 en infektion på 10 % och -2 motsvarar en infektion på 0,01%. Axeln för PCR-analys är logaritmerad. Totalt visas resultatet för 260 prov i diagrammet (2006: 134; 2007: 126).



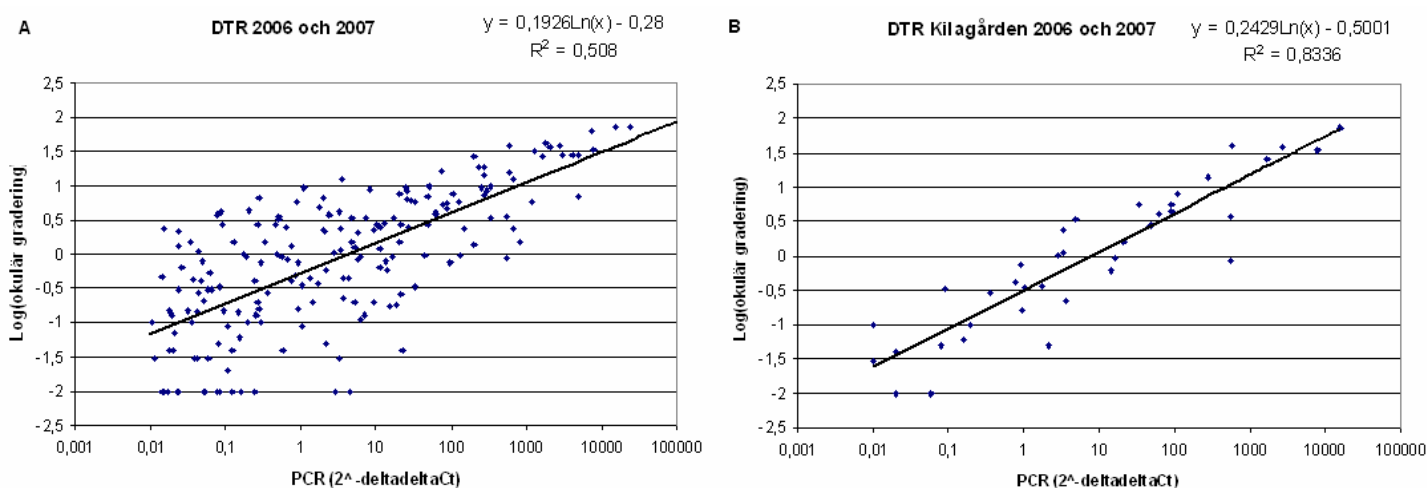
Figur 5. Diagrammet visar korrelationen mellan resultatet från den okulära graderingen (infekterad bladyta i %) samt resultatet från analysen med realtids-PCR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) för prov med *S. tritici*-infektion och samtidigt max. 5% infekterad bladyta av *S. nodorum* och *DTR*.

Korrelationen förbättras ytterligare, från 0.67 till 0.75, när prover med infektion av *S. tritici* och endast max. 5% infekterad bladyta av *S. nodorum* och *DTR* tas med, vilket visas i Figur 5. Flera av punkterna med högt $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -värde och låg okulär gradering ingår då inte i korrelationen i Figur 5, vilket tydligt visar på problemen att göra en korrekt okulär gradering då flera patogener finns närvarande samtidigt.



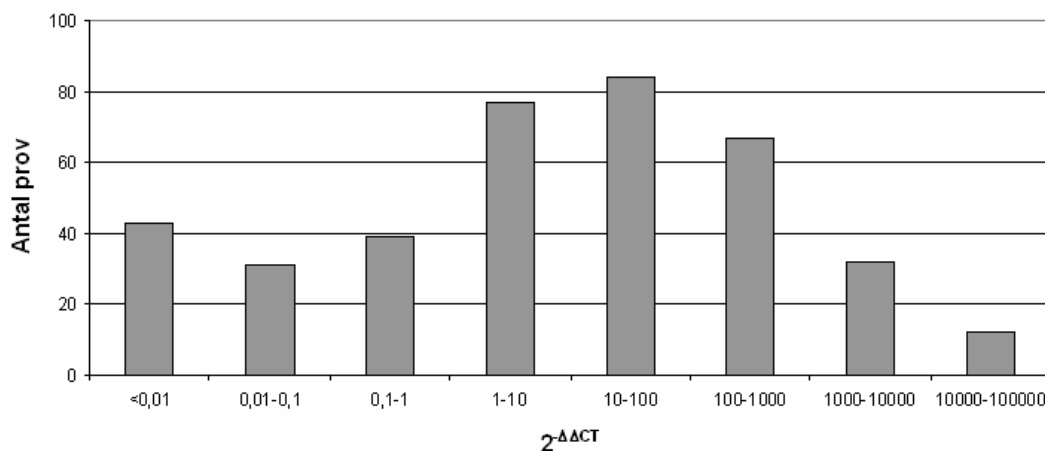
Figur 6. Diagrammet visar korrelationen mellan resultatet från den okulära graderingen (infekterad bladyta i %) samt resultatet från analysen med realtids-PCR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) för prover från 2006 med infektion av *DTR* och samtidigt <5% infektion av *S. tritici* och *S. nodorum*. Värdena för den okulära graderingen visas logaritmerade, t.ex. motsvarar värdet 1 en infektion på 10 % och -2 motsvarar en infektion på 0,01%. Axeln för PCR-analys är logaritmerad.

Under 2006 var *DTR* närvarande i mer än hälften av proven. Av de prov där gradering varit möjlig hade 69% symtom enligt okulär gradering och 95 % var positiva enligt PCR-analysen. Precis som för *S. tritici* erhöles en liknande korrelation även för *DTR* med en korrelationsfaktor (R^2) på 0.56 för samtliga prov och 0.59 för prover med <5% infekterad bladyta av övriga två patogener (Figur 6). Under 2007 var angreppen av *DTR* lägre och *DTR* dominerade endast i ett fåtal prover och korrelationsfaktorn för samtliga prover under både 2006 och 2007 var 0.51 (Figur 7A). Ser man endast till resultaten från den gård där angreppen av *DTR* var tydligast, Kilagården, förbättras korrelationen avsevärt (Figur 7B).



Figur 7. A visar korrelationen mellan resultatet från den okulära graderingen av *DTR* (infekterad bladyta i %) samt resultatet från analysen med realtids-PCR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) för samtliga prover med infektion av *DTR* 2006 och 2007. Totalt visas resultatet för 187 prov i diagrammet (2006: 130; 2007: 57). B visar motsvarande resultat med data endast från Kilagården.

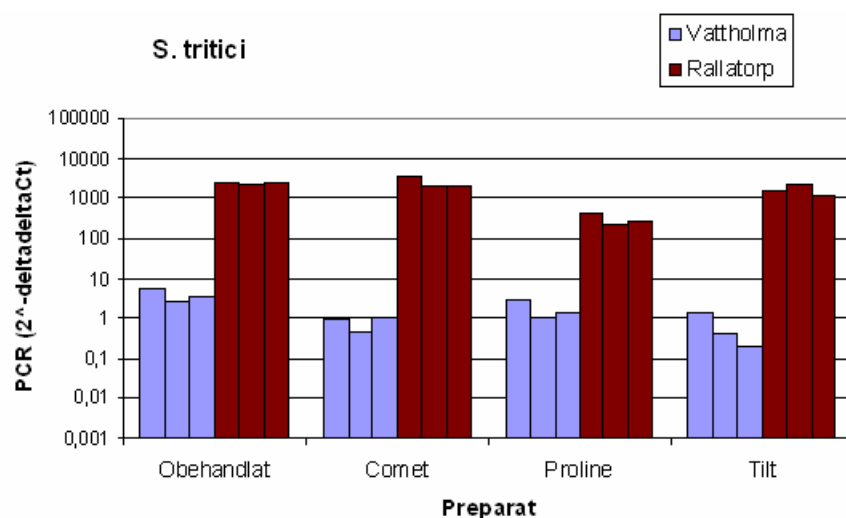
S. nodorum noterades i få prover vid den okulära graderingen och därför går det inte att göra någon korrelation mellan den okulära graderingen och resultat från realtids-PCR-analysen. *S. nodorum* kunde påvisas i 89 % av proverna och de fördelades enligt Figur 8 nedan. Svampen fanns i prover från hela landet utan tydliga regionala skillnader.



Figur 8. Diagram över fördelningen av PCR-analyserna av *S. nodorum*. Samtliga $2^{-\Delta Ct}$ -värden från 2006 och 2007 har delats in i ett antal intervall och staplarna visar antal prov med värde inom respektive intervall.

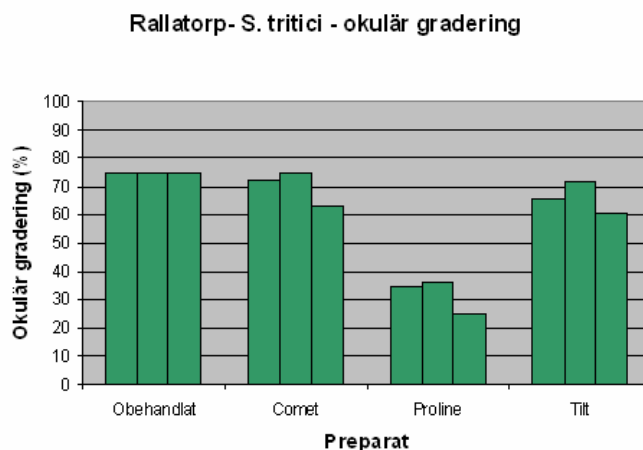
Effekt av fungicid på patogenfloran

Våra resultat från två försöksplatser 2007 visar hur olika situationen var i olika delar av Sverige. Förekomsten av *S. tritici* var ca 1000 gånger större i Rallatorp, Västergötland, än i Vattholma, Uppland, vilket visas i Figur 9.



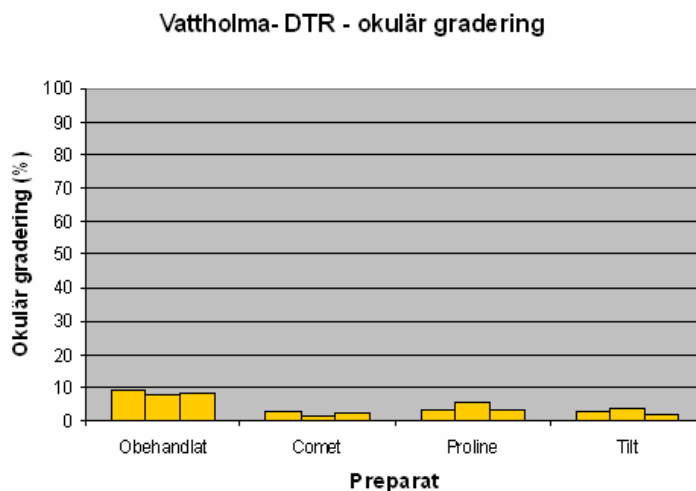
Figur 9. Resultat av PCR-analys ($2^{-\Delta Ct}$) av *S. tritici* för tre block i två försök i Vattholma (L15-1040A) och Rallatorp (L15-1040B), 2007. Doserna av preparaten är Comet 0.5 l/ha, Proline 0.4 l/ha och Tilt 0.25 l/ha. Skalan för PCR-resultatet är logaritmerad.

I Figur 9 ses tydligt den låga variationen mellan upprepningarna i försöken. Det höga PCR-värdet runt 1000 för Rallatorp ger oss förväntningar på kraftiga okulära angrepp vilket också bekräftas av den okulära graderingen, se figur 10. Analyserna med PCR visar att effekten av Proline är signifikant enligt Duncan's multiple range test. Skillnaden i nivå av *S. tritici* mellan Proline och obehandlat är ca 10 gånger.



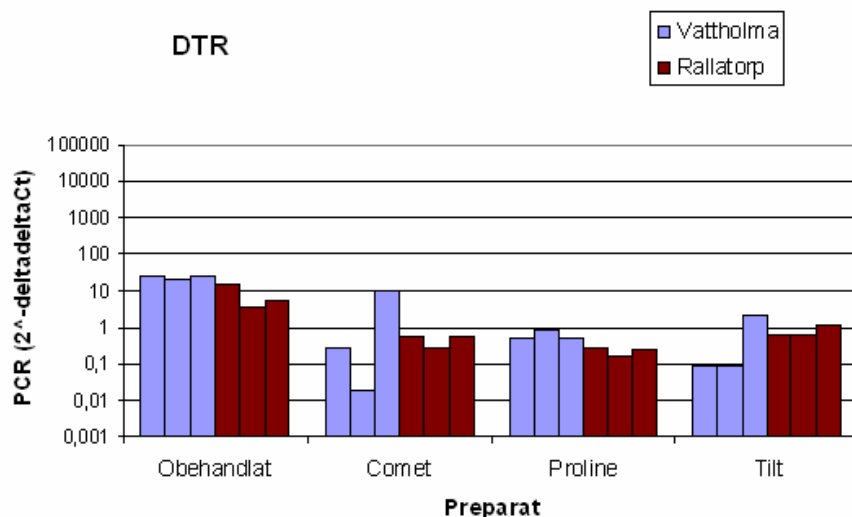
Figur 10. Resultat av den okulära graderingen av *S. tritici* för tre block i Rallatorp (L15-1040B), 2007. Doserna av preparaten är Comet 0.5 l/ha, Proline 0.4 l/ha och Tilt 0.25 l/ha.

I Vattholma var angreppet av svamp relativt lågt, <10% i den obehandlade kontrollen i stadium DC 85, och den dominerande svampen enligt den okulära graderingen var *DTR*, (Figur 11). En viss skillnad i effekt av fungiciderna kan skönjas i den okulära graderingen. Med den kvantitativa PCR-metoden blir fungicideffekten ändå tydligare även om variationen tilltar vid de låga angreppsnivåerna, vilket kanske inte är så förvånande med tanke på hur angreppen kan variera mellan plantor och blad vid låga angrepp (Figur 12).



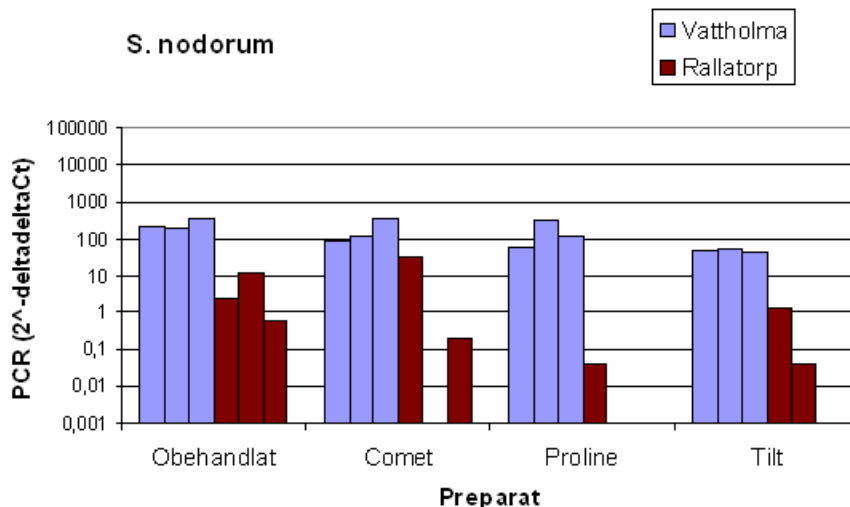
Figur 11. Resultat av den okulära graderingen av *DTR* för tre block i Vattholma (L15-1040A), 2007. Doserna av preparaten är Comet 0.5 l/ha, Proline 0.4 l/ha och Tilt 0.25 l/ha.

Att *DTR* förmodligen var den dominerande svampen stöds också av den kvantitativa bestämningen med PCR (Figur 12). Angreppen av *DTR* var i samma storleksordning i Skara (Rallatorp), men doldes där av kraftiga angrepp av *S. tritici*.



Figur 12. Resultat av PCR-analys ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) av DTR för tre block i två försök i Vattholma (L15-1040A) och Rallatorp (L15-1040B), 2007. Doserna av preparaten är Comet 0.5 l/ha, Proline 0.4 l/ha och Tilt 0.25 l/ha. Skalan för PCR-resultatet är logaritmerad.

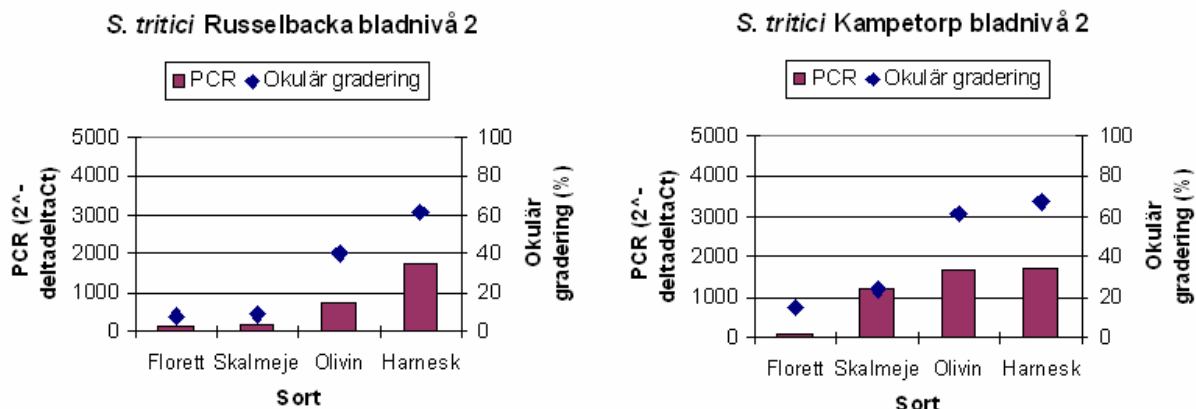
I Vattholma fanns ytterligare en patogen på plats i ganska höga nivåer; nämligen *S. nodorum* (Figur 13). Den noterades inte i de tidiga okulära graderingarna. I slutet av säsongen noterades angrepp av *S. nodorum* (personlig kommunikation Peder Waern). Angreppet av *S. nodorum* tycks inte ha påverkats så mycket av de olika fungiciderna i Vattholma. Tittar man på medelvärden från de tre blocken var behandlingen av Tilt signifikant skild från den obehandlade kontrollen. I Rallatorpsförsöket var angreppsnivån så låg att slumpvariation inte kan uteslutas.



Figur 13. Resultat av PCR-analys ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) av *S. nodorum* för tre block i två försök i Vattholma (L15-1040A) och Rallatorp (L15-1040B), 2007. Doserna av preparaten är Comet 0.5 l/ha, Proline 0.4 l/ha och Tilt 0.25 l/ha. Skalan för PCR-resultatet är logaritmerad.

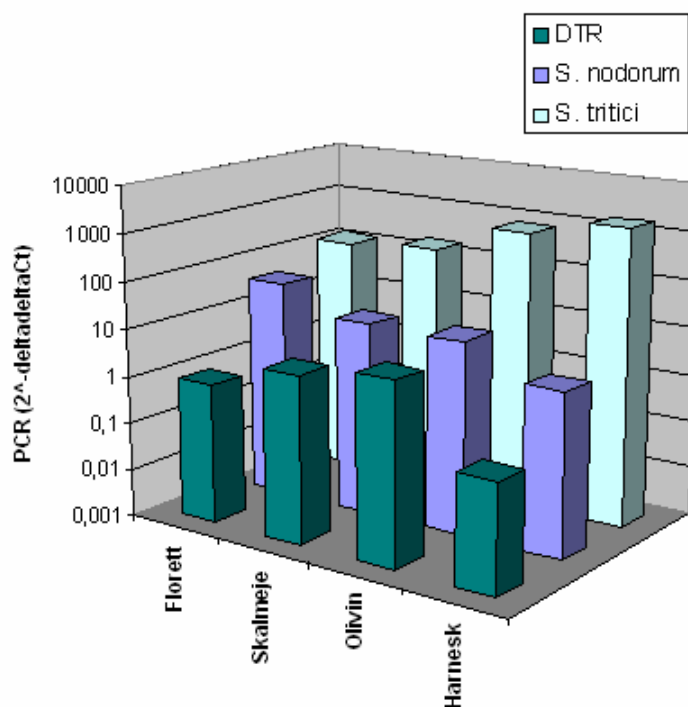
Effektiv sortvärdering med PCR-kvantifiering av patogener

Ser man till angrepp av *S. tritici* uppträdde de fyra sorterna i sortförsöken 2007 på ett likartat sätt både på Russelbacka och på Kampetorp (Västergötland), vilket illustreras i Figur 14. På både Kampetorp och Russelbacka har Florett och Skalmeje signifikant lägre angrepp av *S. tritici* jämfört med Olivin och Harnesk sett till medelvärden från den PCR-analys som gjorts på båda blocken. På Russelbacka är även skillnaden mellan Olivin och Harnesk signifikant.



Figur 14. Okulär besiktning och PCR-bestämning av *S. tritici* i två försök (L7-101) i Västergötland, Russelbacka och Kampetorp, 2007. Diagrammen visar medelvärden från två separata block.

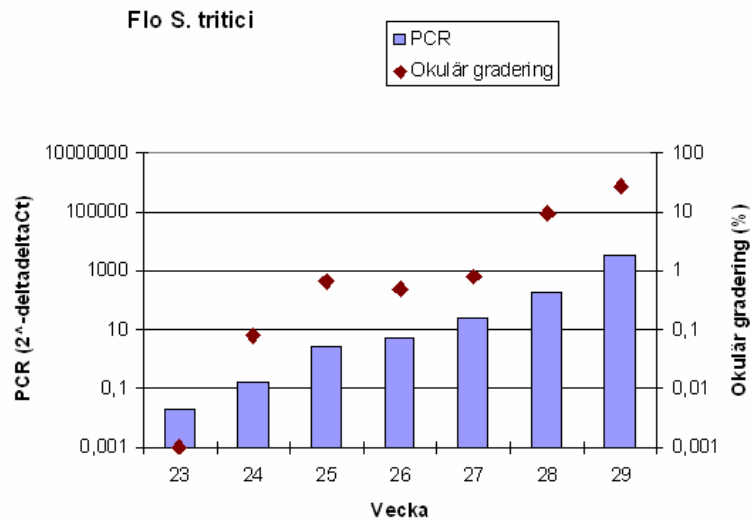
Även om en svamp dominerar angreppet så finns de andra närvarande om än i relativt små mängder, vilket exempelvis visas för Russelbacka i Figur 15. Även för *DTR* noteras skillnader mellan sorterna. Florett och Harnesk har signifikant lägre angrepp av *DTR* jämfört med Olivin. Skillnaderna mellan sorterna för *S. nodorum* är i just detta försök inte signifikanta.



Figur 15. Diagrammet visar resultaten från PCR-analys av *DTR*, *S. nodorum* och *S. tritici* på Russelbacka (L7-101) 2007, för fyra olika sorter; Florett, Skalmjeje, Olivin samt Harnesk. Värdena som visas är medelvärden från två block (bladnivå 2) och skalan för PCR-analysen är logaritmisk.

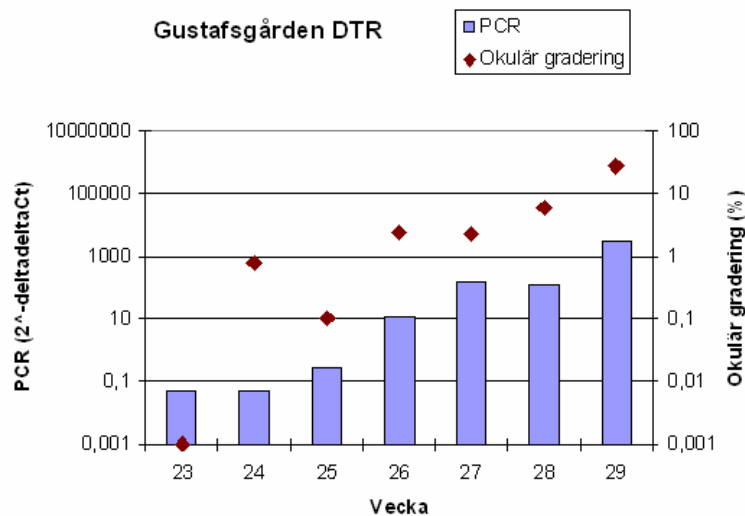
Vilka svampar finns i ett fält?

Våra resultat från upprepade provtagningar under säsongen 2006 och 2007 visar att angrepp av patogenerna också i praktiken kan noteras tidigare med PCR än med enbart okulärbesiktning. Detta visas som exempel för *S. tritici* på Flo (Västergötland, 2006) i Figur 16, för *DTR* på Gustafsgården (Västergötland, 2006) i Figur 17 och för *S. tritici* på Håberg (Västergötland, 2007) i Figur 18.

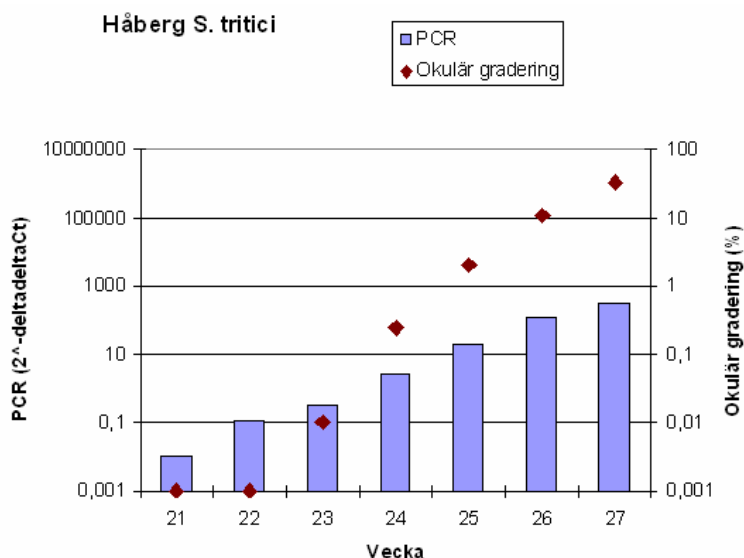


Figur 16. Diagrammet visar hur infektionen av *S. tritici* ser ut över säsongen på bladnivå 2 i Flo (Västergötland, 2006). Resultat visas för både PCR-analys och okulär gradering (med logaritmerade skalor). 0% okulär gradering visas i diagrammet som 0.001%.

Som kan ses i figurerna så upptäcks patogenerna minst en till två veckor tidigare med PCR jämfört med den okulära graderingen. På Gustafsgården visar också PCR-analysen att trots att infektionen av DTR upptäcks vecka 23 så dröjer det till vecka 24-25 innan en tydlig tillväxt av patogenen sker. På Håberg visar det sig dessutom att trots att *S. tritici* har en tydlig tillväxt redan från vecka 21-22 syns inga symptom på bladen förrän vecka 23.



Figur 17. Diagrammet visar hur infektionen av *DTR* ser ut över säsongen på bladnivå 2 på Gustafsgården (Västergötland, 2006). Resultat visas för både PCR-analys och okulär gradering (med logaritmerade skalor). 0% okulär gradering visas i diagrammet som 0.001%.

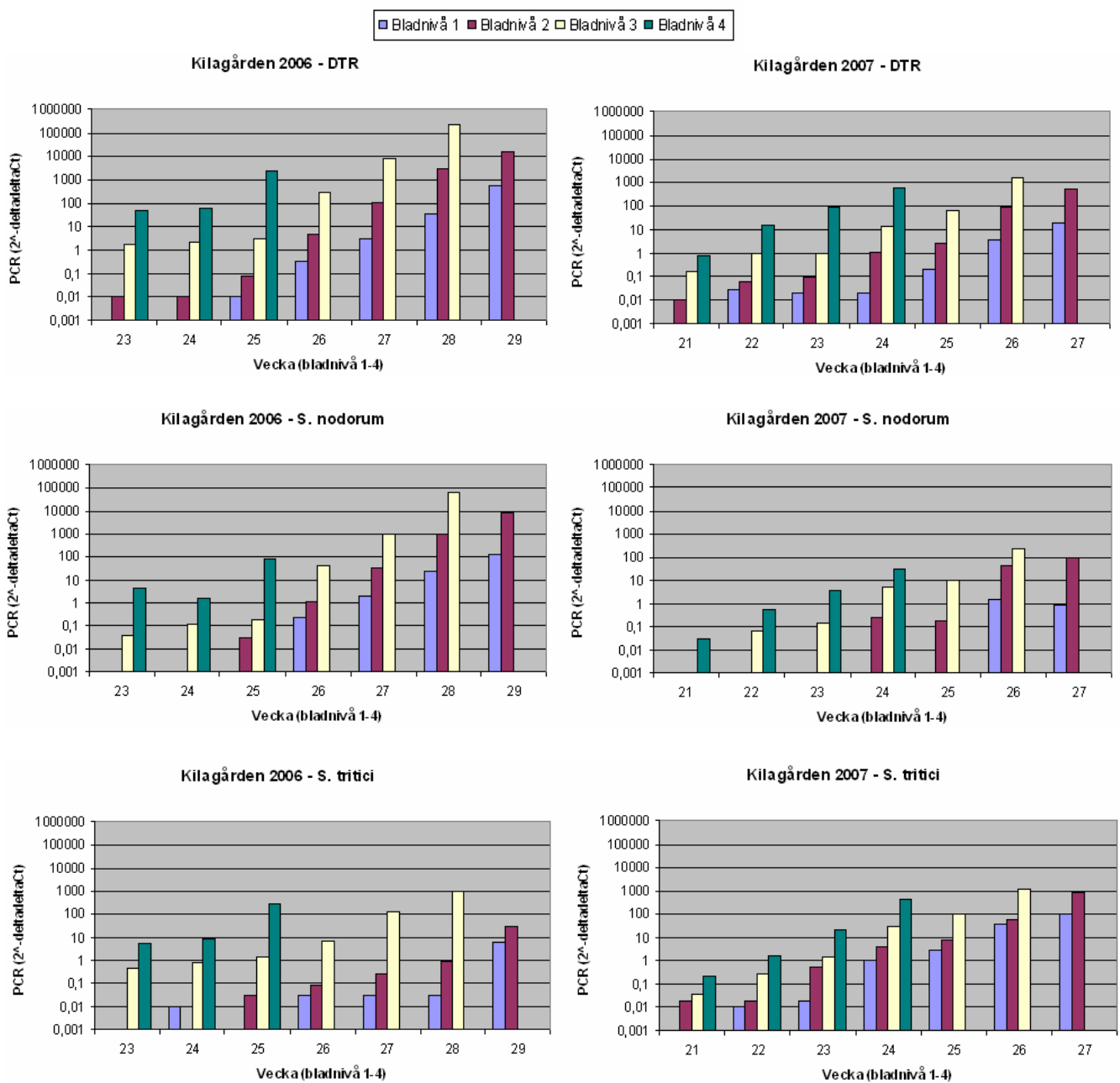


Figur 18. Diagrammet visar hur infektionen av *S. tritici* ser ut över säsongen på bladnivå 2 på Håberg (Västergötland, 2007). Resultat visas för både PCR-analys och okulär gradering (med logaritmerade skalor). 0% okulär gradering visas i diagrammet som 0.001%.

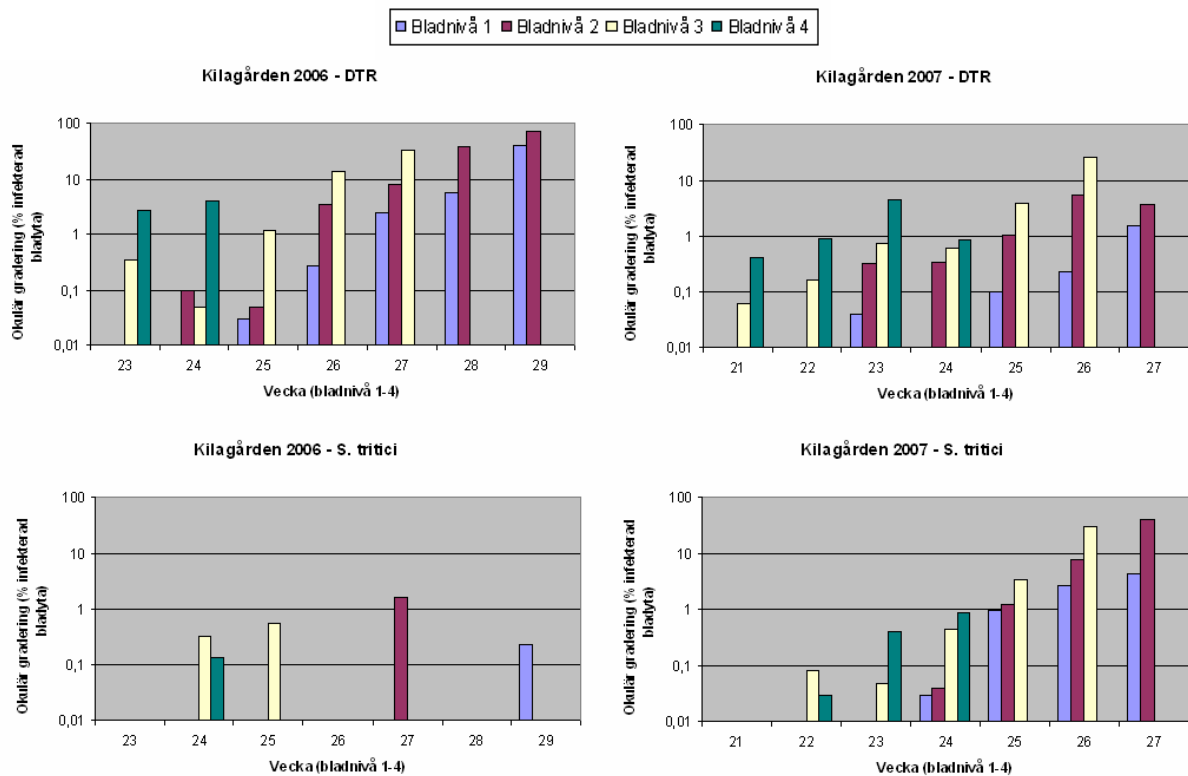
Det är också möjligt att följa hur snabbt de olika patogenerna klättrar i beståndet, som exempelvis på Kilagården (Västergötland) (Figur 19). Förekomsten av de tre patogenerna följdes under en sjuveckors period både 2006 och 2007.

Enligt den okulära graderingen dominerades infektionen under 2006 helt av *DTR* och viss förekomst av *S. tritici* (Figur 20). Men analys med realtids-PCR visade även på en relativt stor infektion av *S. nodorum*. Under v23 kunde *DTR* detekteras på bladnivå 2-4, men det var först v25 som även *S. tritici* och *S. nodorum* kunde detekteras på den höga bladnivån. Från v25 och framåt tillväxte samtliga svampar i det närmaste exponentiellt, vilket tydligt framgår av figur 19.

2007 kunde alla tre patogenerna detekteras på bladnivå 4 i vecka 21. *DTR* och *S. tritici* fanns även på bladnivå 2 och 3, men ingen *S. nodorum* kunde påvisas på dessa nivåer så tidigt på säsongen. Både mängden *DTR* och *S. tritici* ökade exponentiellt på samtliga bladnivåer under de efterföljande 6 veckorna. *S. tritici* var den patogen som tillväxte snabbast på de högre bladnivåerna. I vecka 24 hade flaggbladet en relativ PCR-mängd $2^{-\Delta\Delta Ct}$ på 1.1 och en okulär gradering som visade 0.03% av *S. tritici*. Vid samma tidpunkt kunde *DTR* visserligen detekteras på flaggbladet, men hade förmodligen ännu inte börjat tillväxa ($2^{-\Delta\Delta Ct} < 0,05$). *S. nodorum* påvisades först två veckor senare på flaggbladet. Trots att *S. nodorum* tillväxte på ett liknande logaritmiskt sätt som de andra patogenerna under de senare veckorna så ökade inte infektionen till samma nivåer som *S. tritici* eller *DTR*. Nivån kom heller inte upp i 2006 års värden.



Figur 19. Resultat för PCR-analys ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) av de tre patogenerna på Kilagården 2006 och 2007. Diagrammen visar hur förändringen ser ut över säsongen. År 2006 analyserades ej bladnivå 1 v23, bladnivå 3 v29 samt bladnivå 4 v26-29. År 2007 analyserades ej bladnivå 1 v21, bladnivå 3 v27 samt bladnivå 4 v25-27. Vecka 23-29 2006 motsvaras av DC 37, 45, 57, 75, 75, 77 respektive 83. Vecka 21-27 2007 motsvaras av DC 37, 41, 47, 59, 71, 77 respektive 75.



Figur 20. Resultat för den okulära graderingen på Kilagården 2006 och 2007. Diagrammen visar hur förändringen ser ut över säsongen. År 2006 graderades ej bladnivå 1 v23, bladnivå 3 v 28-29 samt bladnivå 4 v25-29. År 2007 graderades ej bladnivå 1 v21, bladnivå 3 v27 samt bladnivå 4 v25-27. Vecka 23-29 2006 motsvaras av DC 37, 45, 57, 75, 75, 77 respektive 83. Vecka 21-27 2007 motsvaras av DC 37, 41, 47, 59, 71, 77 respektive 75. Observera att skalan för den okulära graderingen visas logaritmerad.

Även på Kilagården kunde patogenerna upptäckas pre-symptomatiskt dvs innan svamparnas karakteristiska bladfläckar kunde iakttagas. 2006 detekterades närvaron av *S. tritici* upp till 5 veckor innan symptomen syntes på bladen (bladnivå 1) och året därpå upp till 3 veckor tidigare (bladnivå 2). Detsamma gällde för *DTR* som med PCR kunde påvisas upp till 2 veckor tidigare jämfört med okulär gradering.

Diskussion

Bestämningen av bladpatogener på vete görs idag med okulära metoder som har flera svagheter. Framförallt är diagnosen av olika symptom osäker, särskilt när flera sjukdomar förekommer samtidigt. Det finns även risk för förväxling med symptom orsakade av annat än parasiter, t.ex. växtnäingsbrister eller s.k. fysiologiska fläckar. Detta gör att såväl lantbrukare som rådgivare ofta undviker att fastställa sjukdomar i ett fält på grund av att det upplevs som alltför osäkert. Vid gradering av fältförsök är okulära metoder dels tidskrävande och dels kräver de tillgång till kvalificerad personal. Detta innebär även att fältförsök som graderas av flera olika personer blir otillförlitliga eftersom metoden är subjektiv. Många fältförsök blir tyvärr inte heller optimalt utnyttjade och utvärderade eftersom en tillförlitlig och kostnadseffektiv graderingsmetod saknas. Detta gäller både fungicid- och sortförsök men även försök med olika jordbearbetningssystem, växtföljder m.m. Metoderna som utvecklats i den här studien har hög reproducerbarhet, hög specificitet och låg detektionsgräns. Detektionsgränsen är i teorin en spor i provet och verkar i praktiken ligga nära detta. Trots denna känslighet så tycks hanteringen av proverna inte leda till några problem med kontaminering mellan prover (Tabell 9). Studien av repeterbarheten visade på en relativ standardavvikelse på ca 20% (Tabell 10) vilket får anses vara mycket bra och det goda samband som noterades mellan samma prover bestämda på två helt skilda laboratorier, ScanBi Diagnostics AB och Eurofins Food/Agro Sweden AB (Figur 3), visar på en mycket god reproducerbarhet och att metoden måste anses vara mycket robust.

Sammanställningarna av data från projektet visar på ett gott samband mellan okulär gradering och kvantitativ bestämning av förekomsten av vetepatogenerna (Figur 4-7). Korrelationskoefficienten förbättras ytterligare då data från provpunkter med stora angrepp av fler än en patogen inte tas med i jämförelsen (Figur 5,6). Detta understryker problemen med den okulära graderingen vid blandinfektioner. Sambandet är också starkare för både *S. tritici* och *DTR* vid högre än vid låga förekomster. Det förklaras förmodligen av som ovan antytts svårigheten att okulärt gradera blandinfektioner, speciellt om nivåerna varierar starkt mellan svamparna. Små förekomster detekteras tillförlitligt med PCR-tekniken, men är svåra att upptäcka även för erfarna växtpatologer. I detta projekt måste också beaktas att den okulära graderingen och PCR-bestämningen inte är gjorda på exakt samma blad. Vid provtagningen användes hälften av bladen för okulär besiktning och andra hälften sparades för DNA-analys. Slumpen kan därför ha medverkat till lite extra variation speciellt vid de låga angreppsnivåerna. Internationellt saknas helt lika omfattande undersökningar som denna, men de som rapporterat samband mellan PCR och okulära symptom från fält och modellstudier har också funnit ett relativt gott samband för *S. tritici* (Fraaije et al 2001, Fraaije et al 2002, Guo et al. 2006, Guo et al. 2007, Rohel et al 2002).

Det är av intresse att så tidigt som möjligt konstatera förekomst av patogener i fält. En tidigare undersökning har visat på möjligheterna att använda PCR för att bestämma angreppsnivån av *S. tritici*, *S. nodorum* och rostsvampar i olika vetesorter (Fraaije et al. 2001). Tidigare studier har också visat på möjligheten att upptäcka angrepp av *S. tritici* innan tydliga visuella symptom uppträder (Fraaije et al. 1999, Fraaije et al. 2001, Fraaije et al. 2002, Guo et al. 2006, Rohel et al. 2002). På de fält där vi följt upp förändringen vecka för vecka, t.ex. på Kilagården (Figur 19,20), har vi också noterat förekomst avsevärt tidigare än vi sett symptom på bladen. PCR-metoderna kan också vara ett hjälpmedel vid osäkerhet om svampen har spridit sig uppåt i beståndet, speciellt vid sval väderlek och för svampar med lång latensperiod som exempelvis *S. tritici*. Generellt var den pre-symptomatiska detektionen tidigare av *S. tritici* jämfört med *DTR*, vilket stämmer överens med det faktum att *S. tritici* har en längre latensperiod (Riaz et al. 1991, Lovell et al. 2004).

Den låga detektionsgränsen hos våra metoder gör det möjligt att tidigt notera även förekomst av sporer på bladen, förmodligen innan de grott och börjat infektera. Utifrån våra resultat föreslår vi därför ett praktiskt gränsvärde för tillväxt av dessa svampar på 0.05 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Under detta gränsvärde sker troligtvis ingen tillväxt av svampen. Över gränsvärdet och upp till 0.5 för *S. tritici* och 0.1 för *DTR* sker tillväxt av svampen utan tydliga, synliga symptom. Symptom kan visserligen förekomma på enskilda blad i beståndet och små förekomster av en svampart kan döljas av en annan. Detta tycks ofta gälla *S. nodorum* och för denna svamp är det svårt att sätta samma typ av gränsvärde eftersom den endast vid ett fåtal fall varit synlig vid den okulära graderingen. Preliminärt sätts samma gränsvärden för *S. nodorum* som för *S. tritici*. Över gränsen på 0.5 respektive 0.1 anses angreppen av svampen som tydliga och värden över 1000 anses vara mycket stora angrepp av svampen, troligen mer än 10-20% infekterad bladyta. Denna typ av klassning har tidigare inte föreslagits.

Tabell 11. Förslag till gränsvärden för bedömning av tillväxt av bladfläcksvampar baserat på värden från relativ kvantitativ PCR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Klass	<i>S.tritici</i>	<i>DTR</i>	
0	0	0	Svampen kan inte påvisas i provet.
1	<0,05	<0,05	Svampen finns i provet i låg mängd, men växer troligtvis inte. Förmodligen inga synliga symptom*.
2	0,05 -0,5	0,05-0,1	Svampen finns i provet i låg mängd och tillväxt sker troligtvis. Förmodligen inga tydliga, synliga symptom*.
3	0,5- 1000	0,1-1000	Tydliga angrepp av svampen.
4	> 1000	>1000	Mycket stora angrepp av svampen. Förmodligen mer än 10-20% angripen bladyta.

*: synliga symptom kan förekomma på enstaka blad i beståndet. Små förekomster av en svampart kan döljas av/i kraftiga symptom av en annan. Detta tycks ofta gälla *S. nodorum*.

Under våren/sommaren 2008 kommer analyserna att erbjudas personer som jobbar med växtskydd, rådgivare m.fl. i SLF-projektet "Gradering av patogenangrepp i vete med kvantitativ PCR-metodik" som pågår 2008-2009. Ett informationsblad om denna diagnosservice tillsammans med ett exempel på ett analysresultat visas i bilaga 4 och 5.

Det är i princip inte möjligt att göra en direkt jämförelse av $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -värden mellan de tre olika patogenerna eftersom mängden av de olika patogenerna i kontrollproven skiljer sig något åt och $2^{-\Delta\Delta Ct}$ anger en differens i antalet kopieringar mellan enskilda sk kontrollprov för en svamp och förekomsten av svampen i provet och dess relation till mängden veteceller i samma prov. Genom att mäta totala DNA-mängden i kontrollproven spektrofotometriskt och utnyttja uppgifter om patogenernas genomstorlek går det att beräkna faktorer baserade på antal genom i kontrollproven som kan användas för att justera $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -värdena och på så sätt få en jämförelse mellan patogenerna. Vad man däremot måste tänka på är att samma antal genom (och därmed antal celler) av olika patogener inte behöver innebära samma nivå av angrepp. Den praktiska betydelsen av skillnaderna vid en absolut jämförelse mellan svamparna minskar också på grund av det faktum att mätområdet för $2^{-\Delta\Delta Ct}$ är mycket stort, från 0,01 till >10000, vilket innebär att en korrektion på 2-3 gånger av värdet för respektive svamp vid jämförelse mellan olikas svampars angrepp har mest "akademiskt värde" (se t.ex. figurerna 4-7). Detta speciellt innan kunskapen har byggts upp kring betydelsen av angreppets storlek mätt i $2^{-\Delta\Delta Ct}$ och effekt på skörd. Möjligheten att utnyttja $2^{-\Delta\Delta Ct}$ för direkta jämförelser utan omräkning mellan svampar förstärks också av att ett $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -värde på 100 ger ungefär

samma okulära värde, ca 10%, på angreppen för *DTR* och *S.tritici* (Figur 4-7). Sammanfattningsvis kan man använda $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -värden för att jämföra nivåer i olika prov för en och samma patogen från olika försöksplatser utan att behöva fundera på att göra denna omräkning och förmodligen begår man inget större känt fel genom att i stora drag jämföra direkt mellan svamparterna.

Metoden som använts för den relativa kvantifieringen av patogenerna innebär att mängden patogen-DNA normaliseras till mängden vete-DNA. Därför är det viktigt att mängden vete är stabil i proverna för att få en korrekt kvantifiering. En eventuell begränsning med denna metod kan vara om en stor del av bladen som analyseras är vissna eftersom mängden vete-DNA då kan ha minskat. För att se om detta påverkat resultatet i studien undersöktes data från en stor mängd prover (data visas ej). När samtliga blad i ett prov ansetts vissna syntes ofta en klar minskning i mängden DNA från vete, men eftersom dessa prover ej kunnat graderas ingick de inte i korrelationen som gjorts mellan PCR-analys och okulär gradering. Prov där mer än hälften av bladen var vissna visade sig inte påverka korrelationen trots att mängden DNA från vete i vissa fall var lägre än normalt. Enskilda vissna blad innebär alltså inget stort problem, och i det fall det är möjligt bör vissna blad inte utgöra allt för stor del av provet. I praktiken kommer förmodligen den här billiga, relativa bestämningsmetoden att fungera väl för att svara på de viktigaste frågorna kring angrepp av bladfläcksvampar i vetet. I den mån att den absoluta kvantifieringen anses nödvändig för vissa frågeställningar är det enkelt att komplettera rent analystekniskt, men priset för analysen kommer då stiga.

Utvecklingen av fungicidresistens har ökat intresset för spannmålssorternas motståndskraft mot olika sjukdomar. Mer kunskap om mottagligheten för de olika svamparterna behövs för att kunna utnyttja sorterna optimalt i olika odlingssystem. T.ex. bör man undvika sorter som är känsliga för *DTR* vid odling med reducerad jordbearbetning och mycket halmrester, som ofta ger stora problem med *DTR*-angrepp. Graderingarna i sortförsöken är idag otillfredsställande och svåra att utnyttja, bl.a. eftersom förväxlingsrisker mellan olika svampsjukdomar och även fysiologiska fläckar gör resultaten osäkra. Fysiologiska fläckar uppträder i vissa sorter och kan vara mycket svåra att skilja från svampsjukdomar. Tillgången till en specifik bestämningsmetod för de viktigaste svampsjukdomarna gör det nu möjligt att säkrare utesluta fysiologiska orsaker och öka kvaliteten på svampgraderingarna i sortförsöken. Resultaten från bestämningarna i sortförsöken visar på signifikanta skillnader mellan sorterna och deras angreppsgrad av olika svampar (Figur 14-15) och alla tre var närvarande. PCR-analysen i sortförsök med kraftiga okulära angrepp av *S. tritici*, visade på en bra överensstämmelse med de okulära graderingarna av samma svampsjukdomar. Observera att denna gradering var noggrannare än den gradering som normalt utförs i sortförsöken. Dessutom kunde PCR-analysen ge information om angrepp av *DTR* och *S. nodorum* som maskerades av de kraftiga *S.tritici*-angreppen i den okulära graderingen. PCR-tekniken ger möjlighet att studera relationen mellan angrepp av de olika sjukdomarna.

Resultaten av undersökningar i fungicidförsök visar att effekterna på svampfloran varierar mellan fungiciderna och att det går att upptäcka signifikanta skillnader även vid låga okulära angreppsnivåer (Figur 9-13). Detta tack vare PCR-analysens stora mätområde (0,01-> 10000). Hur angrepp av en svamp kamoufleras av en annan, ges också som ett gott exempel på Rallatorp 2007 där ett kraftigt *S.tritici* angrepp (100 ggr högre PCR-värde) dolde ett angrepp av *DTR* med en motsvarande okulär gradering på 10% (Figur 9-13). Eftersom valet av lämplig fungicid påverkas av att verkningspektrat skiljer mellan de tillgängliga preparaten blir det viktigt att framgent studera variationer i svampfloras sammansättning på enskilda fält eller regioner i Sverige. Det faktum att också priset skiljer sig åt mellan behandlingarna

medför att en kunskap om vilka svampar som dominerar på ett enskilt fält har betydelse för både val av preparat för optimal biologisk bekämpningseffekt och ekonomi i behandlingen. Svamparnas resistens eller minskade mottaglighet för olika bekämpningsmedel utvecklas kontinuerligt och därför måste också bekämpningsstrategierna förändras. Strobilurinerna (Amistar, Comet m.fl.) blev snabbt mer eller mindre verkningslösa mot *S. tritici* och *DTR* för några år sedan. Eftersom bekämpningen nu nästan helt är beroende av olika triazoler (Proline, Tilt m.fl.) är risken stor att effekten av dessa preparat minskar med tiden. Det är därför värdefullt om den nya specifika bestämningstekniken används i försöksverksamheten.

Kunskap om dessa bladfläcksvampars utbredning i olika delar av Sverige är idag bristfällig. *S. nodorum* var tidigare den dominerande bladfläcksvampen, bl.a. under 1980-talet, och känd för att orsaka allvarliga axangrepp under regniga somrar. Under senare år har *Septoria tritici* dominerat i södra Sverige och *DTR* i mellersta Sverige. De senaste åren har *S. tritici* blivit vanligare även i Mellansverige och 2007 var den t.o.m. den dominerande svampen i hela landet. Symptom av *DTR* förekom detta år nästan enbart norr om Mälaren (Växtskyddsåret 2007, www.sjv.se/vsc). *S. nodorum* har observerats vissa år men sent på säsongen. Resultaten från PCR-analyserna visar att förekomsten av *S. nodorum* förekommer i flertalet av proverna (89%) och i nivåer som indikerar tillväxt (Figur 8), men de okulära graderingarna har inte visat på någon *S. nodorum*. Detta gäller även på Kilagården där utvecklingen följdes extra noggrant under 7 veckor under två år och trots att förekomsten av *S. nodorum* var högre, upptill 10 gånger så stor på vissa blad, jämfört med *S. tritici* (Figur 19-20) så rapporterades inga okulära symptom av *S. nodorum*. Att den okulära graderingen "missat" *S. nodorum* är förmodligen en effekt av förväntningar och av att det är svårt att upptäcka *S. nodorum* eftersom denna svamp uppträder senare på säsongen än t.ex. *S. tritici* (Wainshilbaum et al, 1991). Symptomen maskeras helt enkelt av symptom av andra sjukdomar. Denna förklaring förstärks av att växtskyddsspecialisten Peder Waern, Uppsala, mot slutet av säsongen 2007 noterade förekomst av pyknider av den perfekta formen av *S. nodorum*, dvs *Phaeosphaeria nodorum*, i försöket i Uppland. Den ekonomiska betydelsen av denna svamps angrepp är också numera svårt att bedöma eftersom den inte "finns". Förändringen i svampfloran i vete, dvs nedgång i angrepp av *S. nodorum* och uppgång av *S. tritici*, har dokumenterats i ett vetematerial från Rothamsted från år 1844-2003 och visat sig kunna korreleras med förändringar i nedfallet av svavel. *S. nodorum* tycks ha gynnats av höga nedfall av svavel. (Bearchell et al. 2005)

De nya DNA-baserade metoderna för detektion och diagnos av bladfläcksvampar öppnar för fördjupande forskning och undersökningar inom ekologiska och biologiska frågeställningar såväl som agronomiska. Det kan gälla effekter av odlingssystem eller rena kvantifieringar av effekter av fungicidblandningar. Förhoppningsvis kommer den nya metodiken att bli praktiskt tillgänglig och användas för att bygga upp kunskap för att optimera användning av fungicider och rätt val av sorter.

Referenser

- Almquist C., Lerenius C., Filipsson C., Jonsson A. 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. In manuscript.
- Bearchell S.J., Fraaije B.A., Shaw M.W., Fitt B.D.L. 2005. Wheat archive links long-term fungal pathogen population dynamics to air pollution. PNAS 102(15):5438-5442.
- EPPO Standards PP1. 2004. Efficacy evaluation of fungicides and bactericides. 2nd Edition. 2:32-40.
- Fraaije B.A, Lovell D.J, Rohel E.A, Hollomon D.W. 1999. Rapid detection and diagnosis of *Septoria tritici* epidemics in wheat using a polymerase chain reaction/PicoGreen assay. Journal of Applied Microbiology 86:701-708.
- Fraaije B.A., Lovell D.J., Coelho J.M., Baldwin S. and Hollomon D.W. 2001. PCR-based assays to assess wheat varietal resistance to blotch (*Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum*) and rust (*Puccinia striiformis* and *Puccinia recondita*) diseases. European Journal of Plant Pathology 107:905-917
- Fraaije B.A, Lovell D.J, Baldwin S. 2002 *Septoria* epidemics on wheat: combined use of visual assessment and PCR-based diagnostics to identify mechanisms of disease escape. Plant Protection Sciences 38:421-424.
- Guo J-R, Schneider F, Verreet J-A. 2006. Presymptomatic and quantitative detection of *Mycosphaerella graminicola* development in wheat using a real-time PCR assay. FEMS Microbiology Letters 262:223-229.
- Guo J-R, Schneider F, Verreet J-A. 2007. A real-time PCR assay for quantitative and accurate assessment of fungicide effects on *Mycosphaerella graminicola* leaf blotch. Journal of Phytopathology 155:482-489.
- Iida M, Yamashiro S, Yamakawa H, Hayakawa K, Kuribara H, Kodama T, Furui S, Akiyama H, Maitani T, Hino A. 2005. Development of taxon-specific sequences of common wheat for the detection of genetically modified wheat. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53:6294-6300.
- Lovell D.J., Hunter T., Powers S.J., Parker S.R., Van den Bosch F. 2004. Effect of temperature on latent period of *septoria* leaf blotch on winter wheat under outdoor conditions. Plant Pathology 53:170-181.
- Riaz M., Bockus W.W., Davis M.A. 1991. Effects of wheat genotype, time after inoculation, and leaf age on conidia production by *drechslera tritici-repentis*. Phytopathology 81(10):1298-1302.
- Rohel E.A, Laurent P, Fraaije B.A, Cavelier N, Hollomon D.W. 2002. Quantitative PCR monitoring of the effect of azoxystrobin treatments on *Mycosphaerella graminicola* epidemics in the field. Pest Management Science 58:248-254.

Wainshilbaum S.J. and Lipps P.E. 1991. Effect of temperature and growth stage of wheat on development of leaf and glume blotch caused by *Septoria tritici* and *S. nodorum*. *Plant Disease* 75:993-998.

Zadoks J.C., Chang T.T. and Konzak C.F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed research* 14: 415-421.

Bilaga 1

Fungicidförsök, försöksplatser 2007.

Resultat för obehandlat, Comet 0.5 l/ha, Proline 0.4 l/ha och Tilt 0.25 l/ha visas som $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -värden för respektive patogen. Försöken upprepades i tre olika block. Medelvärden för de tre blocken visas även tillsammans med resultat från Duncans Multiple Range Test. Data från Bodarp, Block 1, Proline saknas (gråmarkerad).

Septoria tritici

	Block	Obehandlat	Comet	Proline	Tilt
Vattholma	1	5,21	0,96	2,88	1,31
	2	2,75	0,48	1,00	0,44
	3	3,77	1,06	1,41	0,20
Rallatorp	1	2574,36	3492,73	423,64	1498,79
	2	2268,94	2002,53	222,88	2303,04
	3	2528,59	2041,22	273,62	1155,68
Vreta	1	1680,50	1146,59	108,42	533,97
	2	2223,09	453,73	417,42	809,82
	3	2539,15	1128,96	73,26	1207,84
Vallby	1	2,00	0,53	0,03	0,61
	2	5,39	0,35	0,02	1,37
	3	1,34	2,07	0,02	4,80
Bodarp	1	13847,29	4788,26		9580,98
	2	40627,13	6162,92	3685,89	16911,37
	3	28979,94	5220,80	1496,26	5032,21

	Obehandlat		Comet		Proline		Tilt	
	Medel för tre block	Duncan gruppering	Medel för tre block	Duncan gruppering	Medel för tre block	Duncan gruppering	Medel för tre block	Duncan gruppering
Vattholma	3,91	A	0,83	BC	1,76	B	0,65	C
Rallatorp	2457,30	A	2512,16	A	306,71	B	1652,50	A
Vreta	2147,58	A	909,76	B	199,70	C	850,54	BC
Vallby	2,91	A	0,98	A	0,02	A	2,26	A
Bodarp	27818,12	A	5390,66	B	2591,08	B	10508,19	B

Stagonospora nodorum

	Block	Obehandlat	Comet	Proline	Tilt
Vattholma	1	230,85	87,05	55,01	45,89
	2	198,66	122,75	300,77	48,51
	3	341,33	328,65	114,02	39,58
Rallatorp	1	2,37	33,30	0,04	1,35
	2	11,91	0,00	0,00	0,04
	3	0,59	0,19	0,00	0,00
Vreta	1	74,87	42,72	1,59	6,08
	2	212,93	10,30	11,25	9,63
	3	158,22	122,51	1,83	11,25
Vallby	1	15,37	4,64	1,08	1,23
	2	73,26	0,77	0,13	0,76
	3	28,06	29,55	0,64	52,01
Bodarp	1	5036,97	755,55		1405,43
	2	16148,15	563,04	88,40	987,45
	3	4047,69	186,70	174,27	1205,21

	Obehandlat		Comet		Proline		Tilt	
	Medel för tre block	Duncan gruppering	Medel för tre block	Duncan gruppering	Medel för tre block	Duncan gruppering	Medel för tre block	Duncan gruppering
Vattholma	256,95	A	179,48	AB	156,60	AB	44,66	B
Rallatorp	4,96	A	11,16	A	0,01	A	0,46	A
Vreta	148,67	A	58,51	AB	4,89	B	8,99	B
Vallby	38,90	A	11,65	A	0,62	A	18,00	A
Bodarp	8410,94	A	501,76	A	131,34	A	1199,36	A

Drechslera tritici-repentis

	Block	Obehandlat	Comet	Proline	Tilt
Vattholma	1	24,99	0,26	0,52	0,09
	2	20,77	0,02	0,90	0,09
	3	25,39	9,59	0,51	2,16
Rallatorp	1	15,03	0,58	0,25	0,65
	2	3,49	0,26	0,17	0,59
	3	5,21	0,55	0,24	1,19
Vreta	1	1,74	1,33	0,10	0,65
	2	41,97	0,33	8,02	2,46
	3	3,63	0,84	0,68	1,91
Vallby	1	3,23	0,00	0,02	0,03
	2	2,71	0,00	0,02	0,91
	3	0,29	0,07	0,01	0,10
Bodarp	1	75,17	36,99		38,25
	2	79,99	0,61	72,18	6,43
	3	984,17	17,64	19,74	8,59

	Obehandlat		Comet		Proline		Tilt	
	Medel för tre block	Duncan gruppering	Medel för tre block	Duncan gruppering	Medel för tre block	Duncan gruppering	Medel för tre block	Duncan gruppering
Vattholma	23,72	A	3,29	B	0,64	B	0,78	B
Rallatorp	7,91	A	0,46	B	0,22	B	0,81	B
Vreta	15,78	A	0,83	A	2,93	A	1,67	A
Vallby	2,08	A	0,02	B	0,02	B	0,35	B
Bodarp	379,78	A	18,41	A	45,96	A	17,76	A

Bilaga 2

Sortförsök, försöksplatser 2007

Resultat för de fyra sorterna visas som $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -värden för respektive patogen. Försöken upprepades i två olika block. Medelvärden för de två blocken visas tillsammans med resultat från Duncans Multiple Range Test.

Septoria tritici

	Block	Florett	Skalmeje	Olivin	Harnesk
Vallåkra	1	140,29	101,16	204,77	878,14
	2	163,58	1345,50	60,60	202,14
Russelbacka	1	55,40	189,13	915,15	1763,24
	2	202,14	173,59	576,42	1725,89
Kölbäck	1	56,30	2,12	221,80	18,51
	2	27,51	62,26	199,52	252,66
Kampetorp	1	144,81	317,98	1350,07	1507,66
	2	49,63	2038,26	2038,26	1924,25

	Florett		Skalmeje		Olivin		Harnesk	
	Medel för två block	Duncan gruppering	Medel för två block	Duncan gruppering	Medel för två block	Duncan gruppering	Medel för två block	Duncan gruppering
Vallåkra	79,65	A	132,37	A	775,14	A	469,37	A
Russelbacka	128,77	C	181,36	C	745,79	B	1744,57	A
Kölbäck	41,91	A	32,19	A	210,66	A	135,59	A
Kampetorp	97,22	B	263,56	B	1694,17	A	1715,96	A

Stagonospora nodorum

	Block	Florett	Skalmeje	Olivin	Harnesk
Vallåkra	1	215,30	0,06	158,58	3,13
	2	0,07	9,21	0,36	0,46
Russelbacka	1	7,96	2,06	19,49	3,89
	2	73,86	22,29	4,73	1,73
Kölbäck	1	20,90	0,04	5,32	0,02
	2	49,36	7,39	14,23	0,12
Kampetorp	1	242,95	6,95	176,06	29,72
	2	74,19	23,65	252,18	34,08

	Florett		Skalmeje		Olivin		Harnesk	
	Medel för två block	Duncan gruppering	Medel för två block	Duncan gruppering	Medel för två block	Duncan gruppering	Medel för två block	Duncan gruppering
Vallåkra	107,69	A	4,64	A	79,47	A	1,80	A
Russelbacka	40,91	A	12,18	A	12,11	A	2,81	A
Kölbäck	35,13	A	3,72	B	9,78	AB	0,07	B
Kampetorp	158,57	A	15,30	A	214,13	A	31,90	A

Drechslera tritici-repentis

	Block	Florett	Skalmeje	Olivin	Harnesk
Vallåkra	1	1,88	0,06	0,44	0,32
	2	1,05	0,08	0,03	1,84
Russelbacka	1	0,26	5,17	8,06	0,25
	2	1,52	1,46	5,54	0,14
Kölbäck	1	0,27	0,01	0,23	0,02
	2	0,03	1,31	4,03	0,03
Kampetorp	1	21,59	0,88	13,18	3,32
	2	21,31	13,77	22,87	4,08

	Florett		Skalmeje		Olivin		Harnesk	
	Medel för två block	Duncan gruppering	Medel för två block	Duncan gruppering	Medel för två block	Duncan gruppering	Medel för två block	Duncan gruppering
Vallåkra	1,47	A	0,07	A	0,24	A	1,08	A
Russelbacka	0,89	B	3,32	AB	6,80	A	0,20	B
Kölbäck	0,15	A	0,66	A	2,13	A	0,03	A
Kampetorp	21,45	A	7,33	AB	18,03	AB	3,70	B

Bilaga 3

Utveckling av patogenerna över säsongen

Resultat för de platser som undersökts visas som $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -värden för respektive patogen vecka för vecka. I samtliga fall analyserades blad från bladnivå 2. DTR står för *Drechslera tritici-repentis*, Sn står för *Stagonospora nodorum* och St står för *Septoria tritici*.

Helleberg 2006

Vecka	DTR	Sn	St
23	0	0	0,2
24	0	0	0,42
25	0,04	0	3,45
26	0,04	1,23	12,88
27	0,75	21,42	8,25
28	3,24	348,55	4,02
29	76,28	2332,73	1173,46

Hästhalla 2006

Vecka	DTR	Sn	St
23	0	0	0,04
24	0	0	0
25	0,02	0,07	0,21
26	1,63	1,27	0,61
27	0,48	5,65	0,21
28	48,79	641,5	12,84
29	256,19	853,14	198,45

Gustafsgården 2006

Vecka	DTR	Sn	St
23	0,05	0	0,11
24	0,05	0,01	4,81
25	0,29	0,22	8,82
26	11,51	1,11	46,89
27	148,58	7,53	114,39
28	124,46	230,32	58,27
29	3122,27	466,73	1704,68

Flo 2006

Vecka	DTR	Sn	St
23	0	0	0,02
24	0	0	0,16
25	0,02	0	2,63
26	0,02	0,41	5,07
27	0,11	2,51	26,13
28	2,02	24,54	184,72
29	4,77	221,71	3094,62

Nolebo 2006

Vecka	DTR	Sn	St
23	0	0	1,67
24	0	0	9,03
25	0,04	0	18,58
26	0,03	0,05	32,65
27	0,28	1,02	123,91
28	11,48	234,64	627,91
29	62,9	4283,52	30804,41

Vinköl 2007

Vecka	DTR	Sn	St
21	0,04	0,01	0,02
22	0	0	0,11
23	0,01	0,01	0,81
24	0,04	0,01	28,59
25	0,01	0,01	75,92
26	1,06	7,57	332,37
27	1,54	8,07	1397,84

Håberg 2007

Vecka	DTR	Sn	St
21	0	0	0,01
22	0	0	0,11
23	0	0	0,33
24	0,04	0,06	2,68
25	0	0,25	20,35
26	0,39	5,97	117,89
27	2,87	18,76	315,97

Rallatorp 2007

Vecka	DTR	Sn	St
21	0	0	0
22	0	0	0,07
23	0,01	0,01	0,31
24	0	0	8,72
25	0,02	0,01	52,69
26	5,84	0,82	532,88
27	40,41	19	7753,08

Ruta Kvarn 2007

Vecka	DTR	Sn	St
21	0	0	0,03
22	0,01	0	0,03
23	0,01	0	0,97
24	0,03	0,01	3,92
25	0,05	0,02	15
26	6,14	1,35	89,01
27	4,46	66,13	206,6

Bilaga 4

SLF-projekt: Bestämning av bladfläckssvampar i vete

Diagnoservice 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 att DNA-sekvenser som är helt unika för varje patogen kopieras till mängder som är detekterbara. 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. Lämnar Du in Ditt prov direkt till laboratoriet går det bra att lämna in färska 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. Lämnar 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, 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, 0501-605862) eller Anders Jonsson på SLU i Skara (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

Följesedel

Bladfläckssvampar på vete

Uppdragsgivare: _____

Kontaktperson: _____

Fakturaadress: _____

Postadress: _____

Telefon: _____

E-post: _____

Provuppgifter

Provmärkning	Provtagningsplats/ort	Bladnivå

Egen gradering eller andra upplysningar: _____

Bilaga 5

Analysresultat

- bladfläckssvampar i vete

Provinformation

Provnummer	Märkning	Plats/ort	Bladnivå
06-28-1	A		3
07-24-1	B		4
07-27-1	C		2
07-27-2	D		2
07-28-1	E		2

Resultat med preliminär klassning av infektionen

Provnummer	Svamp	Analysresultat ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Klass 0	Klass 1	Klass 2	Klass 3	Klass 4
06-28-1	<i>S. tritici</i>	22069,02					X
	<i>S. nodorum</i>	905,78				X	
	<i>DTR</i>	50,20				X	
07-24-1	<i>S. tritici</i>	213,56				X	
	<i>S. nodorum</i>	339,19				X	
	<i>DTR</i>	0,02		X			
07-27-1	<i>S. tritici</i>	108,42				X	
	<i>S. nodorum</i>	1,59				X	
	<i>DTR</i>	0,10			X		
07-27-2	<i>S. tritici</i>	0,02		X			
	<i>S. nodorum</i>	0,64				X	
	<i>DTR</i>	0,01		X			
07-28-1	<i>S. tritici</i>	2002,53					X
	<i>S. nodorum</i>	<0,01	X				
	<i>DTR</i>	0,26				X	

Observera att värdena för analysresultatet ej kan jämföras direkt mellan svamparna.

Förklaringar

Svampar

<i>S. tritici</i>	<i>Septoria tritici</i> som orsakar svartpricksjuka
<i>S. nodorum</i>	<i>Stagonospora nodorum</i> som orsakar brunfläcksjuka
<i>DTR</i>	<i>Drechslera tritici-repentis</i> som orsakar vetets bladfläcksjuka

Klassningar

Klass 0	Svampen kan inte påvisas i provet.
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 enstaka blad i beståndet. Små förekomster av en svampart kan döljas av kraftiga symptom av en annan. Detta tycks ofta gälla *S. nodorum*.

Frågor?

Kontakta:
Charlotta Almquist
charlotta.almquist@lantmannen.com
0510-88725

Mer information om metoden finns i rapporten "Bestämning av förekomst av patogena svampar i vete med PCR-teknik" på <http://po-mv.slu.se/> under rubriken "Publikationer".

Förteckning över utgivna rapporter på Avdelningen för Precisionsodling:

1. Lundström, C., Roland, J., Tunared, R. och Lindén, B. 2004. Jämförelser mellan jordbearbetningssystem på lätt och styv lera – produktion, ekonomi och risk för kväveförluster i två försök med sexåriga växtföljder. Resultat från undersökningar vid Östads säteri i Västergötland 1996 – 2003.
2. Stenberg, M., Delin, K., Roland, B., Söderström, M., Stenberg, B., Wetterlind, J. och Helander, C.A. 2005. *Utveckling av hållbara och produktiva odlingssystem – karakterisering av lerjord. Developing sustainable and productive cropping systems – characterisation of a clay soil.*
3. Stenberg, M., Myrbäck, Å., Lindén, B., Rydberg, T. 2005. Inverkan av tidig och sen jordbearbetning under hösten på kväveminaliseringen under vinterhalvåret och på utlakningsrisken på en lerjord.
4. Lindén, B. och Engström, L. 2006. Höstraps, havre och ärter som förfrukter till höstvetete – inverkan på kvävedynamiken i marken och på vetets avkastning. *Winter oilseed rape, oats and field peas as crops preceding winter wheat – effect on nitrogen dynamics in the soil and on wheat yields.*
5. Lindén, B., Lerenius, C., Nyberg, A., Delin, S., Ferm, M., Torstensson, G., Hedene, K-A., Gruvaeus, I., Tunared, R. och Roland, J. 2006. Kan växtskyddsåtgärder minska kväveförlusterna vid odling av höstvetete?
6. Wetterlind, J., Stenberg, B., Stenberg, M. och Lindén B. 2006. Tidig höstplöjning på lerjordar – riskbedömning av kväveutlakning. *Mouldboard ploughing in early autumn on clay soils - risk assessment of nitrogen leaching.*
7. Lundström, C (red.). 2006. Precisionsodling 2005 - verksamhet vid Avdelningen för precisionsodling.
8. Lindgren, J., Stenberg, M och Lindén, B. 2007 Teknik för maximerat kväveutnyttjande och minimerad kväveutlakning i potatisodling.
9. Larsson, S., Stenberg, M., Gruvaeus, I. och Engström, M. Odlingssystem för grovfoderproduktion med förbättrad avkastning och produktionsekonomi.
10. Wetterlind, J., Jonsson, A och Stenberg, B. 2007. Indelning av fält i mineraliseringszoner för varierad kvävegödsling. *Establishment of mineralization zones for variable rate nitrogen application.*
11. Stenberg, M., Etana, A., Bergkvist, G., Wetterlind, J., Myrbeck, Å., Aronsson, H., Rydberg, T. och Lindén, B. 2007. Uthålliga täckgröde- och fånggrödesystem.
12. Lundström, C. (red). 2007. Precisionsodling 2006 – verksamhet vid Avdelningen för precisionsodling.
13. Lundström, C. 2007. Hållbar utveckling för stad och land – en storyline om samarbete i en region.
14. Lindén, B. 2008. Efterverkan av olika förfrukter: inverkan på stråsädesgrödors avkastning och kvävetillgång - en litteraturöversikt.
15. Nyberg, A. och Lindén, B. 2008. Åkerbönor som förfrukt till vårsäd i ekologisk odling. *Faba beans as previous crop to spring cereals in organic farming.*
16. Engström, L. och Lindén, B. 2008. Kväveförsörjning i ekologiska odlingssystem med vall - höstraps - vete. N-supply in organic cropping systems with ley – winter oilseed rape – wheat.
17. Lundström, C. (red). 2008. Precisionsodling 2007 – verksamhet vid Avdelningen för precisionsodling.
18. Almquist, C., Lerenius, C., Filipsson, C., och Jonsson, A. 2008. Bestämning av förekomst av patogena svampar i vete med PCR-teknik.

Avdelningen för precisionsodling, Institutionen för markvetenskap, SLU, Skara, (tidigare Institutionen för jordbruksvetenskap Skara) bedriver forskning med precision i odlingen som mål. Detta forskningsarbete tar sikte på att utveckla metoder för bättre utnyttjande av markens resurser samt styrning av processer som inverkar på grödornas tillväxt, framför allt genom bättre växtnäringshushållning, bl.a. platsspecifikt för tillämpning inom precisionsjordbruket. Forskning bedrivs främst i fältstudier och fältförsök. Huvudsyftet med denna forskning är att förstärka den ekonomiska uthålligheten i svenskt lantbruk genom att förbättra grödornas avkastning och jordbruksprodukternas kvalitet och samtidigt utnyttja våra naturliga tillgångar på ett miljövänligt och resursbevarande sätt. Forskning, utbildning och information präglas av helhetssyn och sker i nära samarbete med näringsliv, myndigheter och rådgivning. Lanna försöksstation är en viktig resurs för avdelningen, övriga institutioner vid SLU samt andra samarbetspartners.

I serien **Rapporter** redovisas forsknings- och försöksresultat från Avdelningen för precisionsodling, SLU, Skara.

Rapporterna finns tillgängliga på nedanstående Internetadress.

*Reports with research results from the Division of precision agriculture
(Department of Soil sciences, Swedish University of Agricultural Sciences).
The reports are available at the internet address given below.*

Distribution:

Avdelningen för precisionsodling
Institutionen för markvetenskap
Sveriges lantbruksuniversitet
Box 234
532 23 Skara

Tel. 0511-670 00, fax 0511-67134
Internet: <http://po-mv.slu.se>