

Nye diagnosemetoder til udsædsbårne sygdomme

Nye diagnosemetoder giver mulighed for at skelne udsædsbårne svampearter, som hidtil har været meget vanskelige eller umulige at adskille med konventionelle metoder.



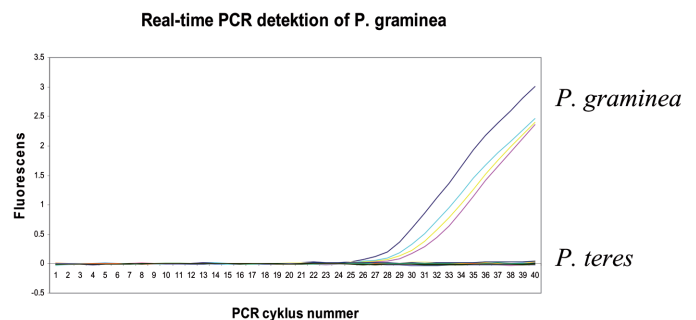
Seniorforsker Annemarie Fejer Justesen & seniorforsker Hans Pinnschmidt
Danmarks JordbrugsForskning
Afdeling for Plantebeskyttelse og Skadedyr
Plante-/frøpatolog Henrik Jørskov Hansen
Plantedirektoratet, Laboratorium for Diagnostik i Planter, Frø og Foder
annemariefejer.justesen@agrsci.dk

Metoderne, som man benytter til analyse for udsædsbårne sygdomme er oftest baseret på traditionelle metoder, som kræver lange inkubationstider og tidskrævende morfologiske undersøgelser. Inkubationsfaciliteterne er oftest meget pladskrævende, og morfologiske undersøgelser ved hjælp af mikroskopi kræver stor ekspertise. Dette forårsager flaskehalsproblemer især for vintersæden, hvor der kun er en ganske kort periode til rådighed for analyser, før udsæden skal udsås. For økologisk jordbrug er flaskehalsproblemet særligt stort, da samtlige partier bliver undersøgt før udsåning. Desuden er flere af de traditionelle metoder ikke specifikke for de enkelte arter af patogener men giver kun en indikation af omfanget af udsædsbårne sygdomme. Dette forhindrer bl.a., at man kan anvende individuelle tolerancetærskler for de forskellige patogenarter. Dette er f.eks. tilfældet for bygbladplet, *Pyrenophora teres* (ukønnet form: *Drechslera teres*), og bygstribesygge *P. graminea* (ukønnet form: *Drechslera graminea*). Ved anvendelse af den traditionelle inkubationsmetode, hvor man efter 7 dages inkubation af bygkernerne mikroskoper disse og undersøger for forekomsten af *Drechslera* konidier, kan der ikke skelnes mellem de to arter, da de morfologisk er ens. Kun en ekstra og tidskrævende drivhustest, hvor andelen af planter med stribesygesymptomer opgøres, vil kunne sige, hvor mange procent stribesygge kornpartiet indeholder. Tolerancetærsklen for *P. graminea* er i øjeblikket 5% og for *P. teres* er den 15%. Når man anvender den traditionelle inku-

bationsmetode, må man derfor benytte de 5% for både *P. teres* og *P. graminea*, da metoden ikke skelner mellem de to arter. Nogle år kasseres store mængder af økologisk udsæd på grund af høje niveauer af udsædsbårne sygdomme. Da *P. teres* forekommer meget hyppigere end *P. graminea* betyder det, at økologiske udsædspartier vil blive unødigt kasseret.

DNA baserede analysemetoder

Der er efterhånden udviklet DNA-baserede metoder til identifikation af en lang række plante-patogener. DNA-baserede metoder har ofte den fordel, at de er meget specifikke og derfor kan skelne tæt beslægtede arter som f.eks. *P. teres* og *P. graminea*. Desuden er de ofte hurtigere end de traditionelle metoder, idet de ikke kræver lange inkubationstider men kan anvendes direkte på



Figur 1. Specificitet af real-time PCR test for bygstribesygge (*Pyrenophora graminea*). Der ses et signal i prøve med stribesygge DNA men ikke i prøve med bladplet (*P. teres*) DNA.



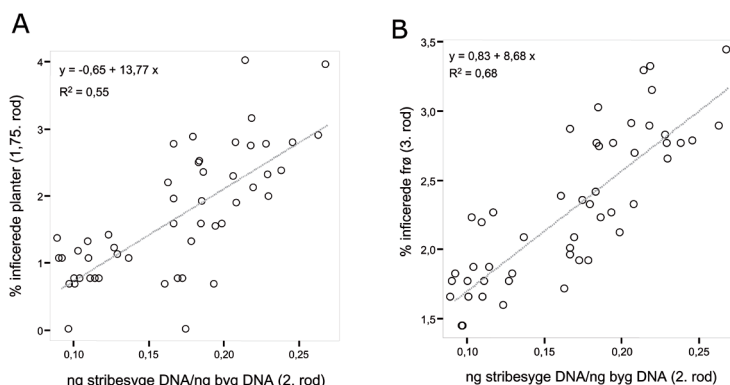
et DNA-ekstrakt fra det inficerede plantevæv. PCR (Polymerase Chain Reaction) er en meget hyppigt anvendt DNA-baseret detektionsmetode. PCR metoden designes til ved hjælp af en enzymatisk reaktion at mangedoble et DNA-stykke, som er specifikt for netop det patogen man ønsker at kunne påvise. I ”real-time PCR” mærkes det mangedoblede DNA med fluorescens, således at man løbende kan følge forøgelsen i mængden af det specifikke DNA-stykke. I figur 1 ses forløbet af en real-time PCR metode udviklet netop til specifikt at kunne detektere tilstedeværelsen af DNA fra *P.*

graminea, hvorimod *P. teres* DNA ikke giver noget signal. PCR metoden er meget følsom, idet den i princippet kun behøver tilstedeværelsen af en enkelt kopi af det specifikke DNA-stykke for at kunne opformere det. Da metoden ligeledes kan skelne svampe-DNA fra plante-DNA, kan analysen udføres direkte på et DNA-ekstrakt af det inficerede væv f.eks. bygkerner. Real-time PCR metoden muliggør ligeledes, at man kan kvantificere mængden af svampe-DNA i en planteprove.

Udvikling af real-time PCR metode for *P. graminea*

I ORGSEED projektet

(<http://www.foejo.dk/forskning/foejoi/vil.html>) har et af målene bl.a. været at udvikle en hurtig metode til påvisning af *P. graminea*, og vi har desuden undersøgt, hvorledes mængden af *P. graminea* DNA i bygprøver á 200 kerner korrelerer med antallet af inficerede kerner og antallet af inficerede planter i væksthustesten. Formålet var at undersøge, om man ved hjælp af PCR-metoden kan forudsige, hvor mange procent inficerede planter man kan forvente at få. Mængden af *P. graminea* DNA er signifikant korreleret med antallet af inficerede frø ($R^2=0.68$, $P<0.001$) (figur 2A) og med antallet af inficerede planter ($R^2=0.55$, $P<0.001$) (figur 2B). Men det ses dog også, at der er store variationer, hvilket skyldes, at mængden af *P. graminea* DNA i hver enkelt frø kan variere meget, og det vil skabe store variationer, når man undersøger sammenhængen mellem den totale mængde *P. graminea* DNA og antallet af inficerede frø. Det er dog en svaghed, som alle metoder, der måler den totale mængde *P. graminea*, vil have. Det optimale ville naturligvis



Figur 2. Sammenhæng mellem mængden af bygstribesyge DNA (normaliseret med mængden af plante DNA) og A % inficerede kerner, B % inficerede planter. PCR data er gennemsnit af to PCR analyser. Data er transformeret.

være, hvis man ved hjælp af PCR kunne undersøge hver enkelt frø for tilstedeværelsen af *P. graminea* DNA, men det vil dog være for kostbart på nuværende tidspunkt. I stedet bruges metoden nu til en kvalitativ analyse af kornprøver, hvor det undersøges, om der er *P. graminea* til stede i prøven. Denne test alene har formindsket kassationsprocenten betydeligt, idet prøver med 5-15% *Pyrenophora* inficerede kerner ikke længere behøver at blive kasseret, hvis der ikke findes *P. graminea* DNA i prøverne (Nielsen, 2005).

Udvikling af real-time PCR metoder for spiringsskadende svampe i hvede

Analysen for spiringsskadende svampe i hvedekerner er langvarig, da kernerne skal inkuberes i 2 uger, før antallet af uspirede kerner og kerner med brune rødder kan opgøres. En PCR metode til påvisning og kvantificering af DNA fra spiringsskadende svampe ville derfor lette arbejdet betydeligt. Vi har udviklet PCR metoder for *Microdochium nivale*, *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* og *F. avenaceum*, alle arter, som bidrager væsentligt til spireskader i hvede i Danmark, og som er vanskelige at skelne morfologisk. Ved hjælp af PCR metoderne er det muligt at undersøge de enkelte arters forekomst i hvedekerner og eventuelt fastlægge individuelle skadetærskler.

Litteratur

Nielsen GC. 2005. Kassationsprocenter som følge af udsædsbårne svampe i økologisk udsæd af korn og bælgssæd i 1999-2004. ■