

# Nordiska äpplen – projekt NordApp

HILDE NYBOM, IBRAHIM TAHIR, LARISA GUSTAVSSON, MARJAN GHASEMKHANI OCH MASOUD AHMADI-AFZADI (SLU), DAG RØEN, KURAB RØEN OCH STEIN HARALD HJELTNES (GRAMINOR AS, NORGE) OCH SAILA KARHU, TUULI HAIKONEN OCH MARJA RANTANEN (LUKE, FINLAND)

Frukt av många olika slag odlas över hela världen, och utgör en viktig del av den totala livsmedelsförsörjningen. I varmare länder är mångfalden stor – former och färger bildar en förförande palett om man besöker en fruktmarknad, liksom doft och smak hos de frukter man väljer att bekanta sig närmare med. I de nordiska länderna sätter klimatet dessvärre stopp för merparten av dessa frukter – men vi har lyckligtvis några, främst kärn- och stenfrukter inom familjen Rosaceae. Äpple har sålunda odlats i de nordiska länderna sedan början av medeltiden, och detta är numera vår i särklass viktigaste frukt, såväl kulturellt som ekonomiskt. Vissa utländska äpplesorter fungerar ganska bra i odling även på våra breddgrader men för merparten blir den korta vegetationsperioden och de stränga vintrarna övermäktiga hinder. Offentligt finansierade växtförädlingsprogram har därför bedrivits i Finland, Norge och Sverige för att ta fram klimatanpassade sorter. På senare tid har ökad omsorg om miljö och hälsa aktualiserat ytterligare ett förädlingsmål: resistens mot olika skadegörare.

## PPP för pre-breeding

Ett nordiskt Public-Private Partnership (PPP) etablerades 2011 av Nordiska ministerrådet (NMR), för att initiera samarbete kring pre-breeding av viktiga växtslag i de fem nordiska länderna. Målsättningen är att utveckla och tillhandahålla växtmaterial som kan användas i tillämpad växtförädling med fokus på klimatanpassning, resistens och efterfrågan från konsumenterna och marknaden. Både privata och offentligt finansierade företag och institutioner är med, och resultaten ska vara fritt tillgängliga för deras växtförädlingsprogram. En 50% medfinansiering tillämpas, vilket innebär att hälften av projektmedlen erhålles från PPP och den andra hälften från partnerföretagen och -institutionerna.

Ett av de tre beviljade projekten hand-



Figur 1. Kräftangripet äppleträd

lade om just äpple: 'Prebreeding for Future Challenges in Nordic Apples', till vardags förkortat Nordapp. PPP bekostas av de nordiska länderna och administreras av Nordiskt Genresurscenter (NordGen), en nordisk institution för bevarande och hållbart nyttjande av växter, husdjur och skog ([www.nordgen.org](http://www.nordgen.org)). När den första projektperioden, 2012–2014, hade avslutats, beslöt man att utlysa medel för ytterligare tre år. En fortsättningsansökning för NordApp beviljades, och projektet löper sålunda vidare fram till och med år 2017.

## Projekt NordApp

I NordApp finns tre medverkande: Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) med forskning och växtförädling av äpple på Balsgård, Finska naturresursinstitutet (LUKE) med forskning och växtförädling av äpple i Piikkiö samt Norska Graminor AS med forskning och växtförädling av äpple i Njøs. Projektledare är Hilde Nybom på SLU. Här kommer vi att beskriva vad vi har utträttat under den första treårsperioden av projektet. Mer information finns också på projektets hemsida:

ppp-apples.nordgen.org samt på hemsidan för ett baltiskt-nordiskt nätverk av frukt- och bärförädlare: mtt.fi/Nordapp.

Bland de problem som har störst ekonomisk betydelse för produktionen av äpple i Norden, finns två typer av svampsjukdomar. Den ena är fruktträdskräfta som angriper träd på fält, och som ofta leder till att hela trädet dör (Figur 1). Den andra utgörs av ett antal olika svampar som angriper frukten under kylagring (lagringsrötter). Vi beslöt att NordApp skulle fokusera på just dessa skadegörare eftersom de har behandlats styvmoderligt inom forskningen globalt sett. Detta beror i sin tur på att vare sig kräfta eller lagringsrötter har samma ekonomiska betydelse i andra länder där man dels använder mer bekämpningsmedel och dels (gäller speciellt kräfta) har ett klimat som inte är lika gynnsamt för skadegöraren.

### Fruktträdskräfta

Skador orsakade av fruktträdskräfta, *Neonectria ditissima*, utgör ett stort problem i länder med svalt och fuktigt klimat. Olika äpplesorter skiljer sig åt i graden av mottaglighet men man har inte lyckats identifiera några speciella resistensgener.

Det behövs bra metoder för att mäta mottagligheten hos olika äpplesorter om man så småningom ska kunna identifiera gener och ta fram DNA-markörer. Vi har använt årsskott som klippts i februari från 60 olika äpplesorter, och sedan placerats i glasflaskor med vatten i ett uppvärmt växthus. Tre knoppar skars försiktigt bort från varje skott, och sedan tillsattes en vattenlösning med sporer av *Neonectria* precis i såret. Två-tre veckor senare kan svampens tillväxt i skottet ses som en missfärgad insänkning i barken (Figur 2). Storleken på denna skada mättes var 5:e dag under drygt en månads tid medan sjukdomen utvecklade sig i skotten, och ett kvantitativt mått på skadans utveckling och omfattning räknades ut. Genomsnittet för sex skott med tre knoppar vardera användes sedan för att jämföra mottagligheten hos de olika sorterna. Hälften av sorterna testades på Balsgård och den andra hälften i Njos. Nio kontrollsorter testades på båda ställena. Analyserna gjordes både 2012 och 2013 på



Figur 2. Sjukdomssymptom på äpplekvistar som inokulerats med kräfta i Njos

Balsgård, och 2013 och 2014 i Njos. I Balsgårdsmaterialet utmärkte sig den amerikanska prydnadsapeln Prairiefire, Balsgårdssorten Aroma samt en äldre svensk lokalsort, Frösåker, som speciellt motståndskraftiga (Figur 3). Under 2012 hade även Golden Delicious och Santana mycket god motståndskraft. Dessa resultat har publicerats (Ghasemkhani m.fl. 2015, Nybom m.fl. under tryckning).

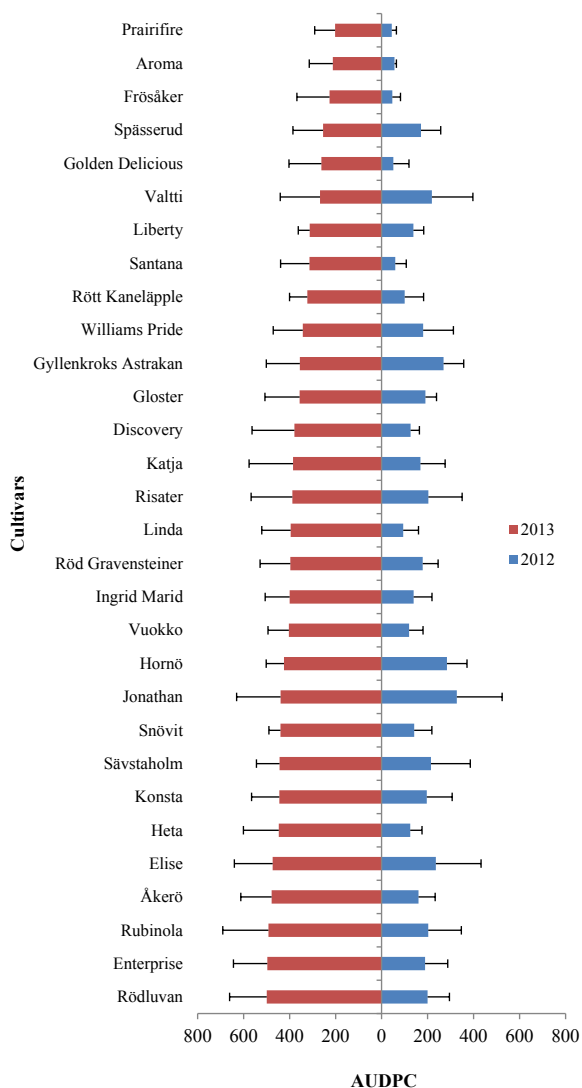
Ytterligare tre undersökningar rörande kräfta har också delvis finansierats inom NordApp. I en av dessa, framställde vi preparat av vävnad från frisk respektive kräftangripen ved av både äppelträd och avklippta skott av äpple (Ghasemkhani 2015, Ghasemkhani m. fl., manuskript under revision). Vi kunde inte se några anatomiska skillnader mellan olika äpplesorter när preparaten undersöktes med ljusmikroskop, men den motståndskraftiga sorten Santana hade färre svamphyfer i veden och stod uppenbarligen emot svampangreppet under en längre tid jämfört med den betydligt mer mottagliga Cox's Orange.

I en annan undersökning, extraherade vi DNA ur ved från kräftinokulerade äppelträd. Dessa DNA-prover analyserades sedan tillsammans med speciella DNA-sekvenser som känner igen DNA av just *Neonectria ditissima* och ingen

annan art. Förekomst av svampen kunde påvisas i DNA-prov tagna i infekterad vävnad medan prover tagna strax utanför infektionsstället gav negativt resultat (Ghasemkhani 2015, Ghasemkhani m.fl. manuskript under revision). Mängden påvisat *Neonectria*-DNA visade dessutom ett positivt samband med äpplesortens tidigare fastställda grad av mottaglighet. Målet är att ta fram en metod som är så känslig att den kan registrera förekomst av svampen redan innan symptomen blir synliga.

I den tredje undersökningen analyserade vi genetisk variation hos ett antal DNA-prov av *Neonectria ditissima* (Ghasemkhani 2015). Dessa prov kom från insamlingar runt om i Sverige, samt från Belgien där det finns stora plantskolor som säljer äppelträd till svenska odlare. Vi använde två sorters DNA-markörer: SSR (simple sequence repeats) och AFLP (amplified fragment length polymorphism) för att kvantifiera variationen hos 44 olika DNA-prov. Tyvärr hittade vi inget samband mellan det geografiska avståndet och det genetiska avståndet för olika DNA-prov, och därmed blir det svårt att använda denna teknik för att identifiera olika smittkällors ursprung.





Figur 3. Genomsnittligt AUDPC-värde för sjukdomssymptom hos äpplesorter som inokulerats med kräfta på Balsgård

### Lagringsrötter

Infektion av vissa svampar som *Neofabraea malicorticis*, *N. perennans* och *N. alba* (gloeosporiumröta), *Glomerella acutata* (bitterröta) och *Penicillium expansum* (grönmögel), ger rötskador (lagringsrötter) i kylagradad frukt. Detta orsakar årligen ett stort bortfall, särskilt i frukt som odlats ekologiskt. Några resistensgener har ännu inte identifierats. Sortskillnader i mottaglighet mot olika lagringsrötter beror nog främst på variation i uppbyggnad och kemiskt innehåll hos äpplesorternas skal och fruktkött.



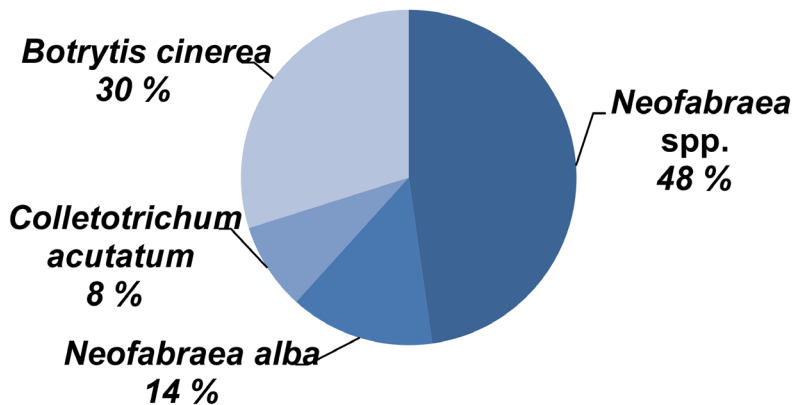
Figur 4. Symptom av grönmögel efter inokulering på Balsgård av tre äpplesorter; Rome Beauty (t.v.), Golden Delicious och Freiherr von Berlepsch (t.h.)

Redan 2011 påbörjades en serie inokuleringar av nyskördad frukt med sporer av grönmögel och bitterröta på Balsgård inom ett Formas-finansierat projekt (Ahmadi-Afzadi m.fl. 2013). Detta arbete utvecklades vidare inom NordApp: under 2012 och 2013 inokulerades 81 andra äpplesorter på Balsgård och i Njøs (inklusive 10 gemensamma kontrollsorter) med sporer av grönmögel (Tahir m.fl. 2015). Vid dessa inokuleringar injiceras 20 mikroliter av spörlösningen med en pipett på två sidor av totalt 45 frukter per äpplesort. När frukten legat i vanligt kylager (+3 °C) i 6 veckor (tidigmognande sorter) eller 12 veckor (senmognande), mäter vi storleken på den uppkomna skadan. Ju mindre fläck, desto motståndskraftigare sort (Figur 4). Allra störst motståndskraft mot grönmögel visade den kinesiska sorten Fu Shuai, som analyserades i Njøs. Vi undersöker även fruktens fasthet både vid skörd och efter lagring eftersom detta visat sig ha stor betydelse för rötornas utveckling.

Under 2014 inokulerades ytterligare 85 sorter med grönmögel tillsammans med 6 kontrollsorter på Balsgård. Dessa resultat kommer att redovisas när inokuleringdata erhållits även för 2015.

Det är betydligt svårare att lyckas med pipett-baserade inokuleringar med *Colletotrichum acutatum* och *Neofabraea alba* eftersom skadad frukt ofta angrips av det allerstädes närvarande och betydligt aggressivare grönmöglet. Viss metodutveckling har dock företagits hos alla tre partners. I Piikkiö har dessutom frukt av 26 ekologiskt odlade sorter utvärderats för spontana infektioner av olika röttsvampar 2013 och 2014 (Nybom m. fl. under tryckning) (Figur 5). I oskadad frukt är det uppenbarligen *Neofabraea* spp. samt *Botrytis cinerea* som är de största problemen, åtminstone i denna finska odling.

Eftersom det kemiska innehållet i frukten kan ha stor betydelse för motståndskraft mot lagringsrötter, har vi analyserat mängden äpplesyra samt 10 olika fenolämnen i skal och fruktkött av 24 äpplesorter på Balsgård (Ahmadi-Afzadi m. fl. 2015). Båda totalmängden fenoler och mängden av vissa individuella fenolämnen, som flavonoler och procyanidin 2 i inokulerad frukt, visade stark korrelation med motståndskraften hos de undersökta sorterna.



Figur 5. Spontana angrepp av lagringsrötter i ekologisk frukt, utvärderad i Piikkiö.

### DNA-analyser

Korrekt identifikation av det analyserade sortsmaterialet är förstås viktigt för framtida tolkning och användning av erhållna forskningsdata. Merparten av de äpplesorter som ingått i inokuleringarna på Balsgård, har blivit undersökta med SSR-markörer. År 2013 analyserades alla kontrollsorter med SSR så att vi kunde vara säkra på att samlingarna på Balsgård och i Njøs innehåller identiska genotyper. Under 2014–2015 har vi även analyserat ytterligare 69 sorter som använts i olika inokuleringar i Njøs.

Många av Balsgårdssorterna har dessutom analyserats för 480.000 SNP-markörer inom internationella projektet Fruitbreedomics. Vi har sedan jämfört grönmögel-data för drygt 200 äpplesorter, som inokulerats på Balsgård, med samma sorters SNP-markörer i hopp om att hitta några samband. Tyvärr fick vi inga signifikanta samband, men vi hade troligen för få sorter. När vi fått inokuleringsdata för fler äpplesorter, kommer vi att göra nya analyser i hopp om att identifiera en eller flera SNP-markörer, som är korrelerade med graden av mottaglighet för grönmögel.

### Referenser

- Ahmadi-Afzadi M, Tahir I, Nybom H. 2013. Impact of harvesting time and fruit firmness on the tolerance to fungal storage diseases in an apple germplasm collection. *Postharvest Biol. Technol.* 82: 51–58
- Ahmadi-Afzadi M. 2015. Genetic variation in resistance to fungal storage diseases in apple. Inoculation-based screening, transcriptomics and biochemistry. *Akademisk avhandling*, 2015:18, SLU, <http://pub.epsilon.slu.se/11903>
- Ahmadi-Afzadi M, Nybom H, Ekholm A, Tahir I, Rumpunen K. 2015. Biochemical contents of apple peel and flesh affect level of partial resistance to blue mold. *Postharvest Biol. Technol.* 110: 173–182.
- Ghasemkhani M, Liljeroth E, Sehic J, Zborowska A, Nybom H. 2015. Cut-off shoots method for estimation of partial resistance in apple cultivars to fruit tree canker caused by *Neovectria ditissima*. *Acta Agricult. Scandinav., Sect. B – Soil and Plant Science*, DOI: 10.1080/09064710.2015.1016101

Ghasemkhani M, Holefors A, Marttila S, Zborowska A, Rur M, Rees-George J, Nybom H, Everett K, Scheper R, Garkava-Gustavsson L. Real-time PCR for detection and quantification, and histological characterization of *Neovectria ditissima* in apple trees. *Trees – Structure Function*, Revised manuscript submitted.

Ghasemkhani M. 2015. Resistance against fruit tree canker in apple – evaluation of disease symptoms, histopathological and RNA-seq analyses in different cultivars, genetic variation of *Neovectria ditissima*. *Akademisk avhandling*, 2015:77, SLU, <http://pub.epsilon.slu.se/12495/>

Nybom H, Røen D, Karhu S, Garkava-Gustavsson L, Tahir I, Haikonen T, Røen K, Ahmadi-Afzadi M, Ghasemkhani M, Sehic J, Hjeltnes S-H. Prebreeding for future challenges in Nordic apples; susceptibility to fruit tree canker and storage diseases. *Acta Horticult.*, under tryckning.

Tahir I, Nybom H, Ahmadi-Afzadi M, Røen K, Sehic J, Røen D. 2015. Susceptibility to blue mold caused by *Penicillium expansum* in apple cultivars adapted to a cool climate. *Europ. J. Horticult. Sci.* 80: 117–127, <http://pubhort.org/ejhs/80/3/4/index.htm>

Faktabladet är utarbetat på LTV-fakultetens Institution för växtförädling, Balsgård [www.slu.se/balsgard](http://www.slu.se/balsgard)

Projektet har finansierats av Nordic Public-Private Partnership for prebreeding.

Projektansvarig: Hilde Nybom, [hilde.nybom@slu.se](mailto:hilde.nybom@slu.se)

<http://epsilon.slu.se>