

Bioforsk FOKUS

Vol. 1
Nr. 17
2006

Spragleflekk - biologi, smittekilder og smittebetingelser

Saideh Salamati¹⁾ og Lars Reitan²⁾

¹⁾ Midt-Norsk Plantevern AS ²⁾ Graminor AS

ISBN 82-17-00110-3
ISBN 978-82-17-00110-2



Sammendrag

Spragleflekk er en av de viktigste byggsykdommer i Midt-Norge. I 2005 registrerte vi angrep på opp mot 90 % av bladarealet på enkelte byggsorter. Sykdommen ble for første gang påvist både på havre og kveke i Midt-Norge. Forsøk med kunstig smitte ga et angrep på 40 % på sorten Lavrans. De andre byggsorter i forsøket (Thule og Gaute) hadde lite angrep. Derimot ble sopp isolert fra både blad og stengel til alle tre sortene. Dette tilsier at spragleflekkssoppen kan være latent for lange perioder. I byggårer starter sykdommen snikende med få store flekker på eldre blad. Fuktighetsfaktorer de første 10 dagene i juni har stor påvirkning på det endelige sykdomsnivået. Undersøkelse av 230 isolat av *Ramularia collo-cygni* har vist at sopp produserer fargestoffer (rubelliner) i stressete situasjoner. Vi presenterer en teori om relasjonen mellom sopp og byggplanten.

Innledning

Byggsykdommen spragleflekk er nå den viktigste kornsykdommen i Midt-Norge. Sterke angrep ble registrert i 2005 (Tabell 1). I dette året ble også for første gang sykdommen registrert på havre og kveke (*Elytrigia repens*). Spragleflekk er funnet på andre grasarter (havre, kveke, hvete, mais) også andre steder i Europa (Huss 2002). Figur 1-3 viser symptomer av spragleflekk på bygg, havre og kveke. I forbindelse med prosjektet Bioforsk VIPS og en forsøksserie innen kornkvalitet ledet av Graminor AS, fulgte vi utvikling av sykdommer flere steder i Midt-Norge. Med støtte fra Graminor AS og lokale myndigheter fikk vi også mulighet til å arbeide videre med biologi og epidemiologi av sopp *Ramularia collo-cygni* som forårsaker spragleflekk. Over 230 isolat av sopp ble innsamlet (både fra bygg og havre). Forsøk med utvikling av en metode for kunstig smitte i kontrollert klima ble gjennomført i 2005. Her presenterer vi et sammendrag av arbeidet.

Tabell 1. Sykdomsbilde for bygg i Midt-Norge i 2005 (tall for sykdomsnivå gir et helhetsbilde for angrepet av hver byggsykdom i ubehandla forsøksledd).

Sted	Reg. dato 2005	Spragleflekk %	Grå øyeflekk %	Bygg-brunflekk %	BBCH
Fannrem	29.07.	75	20	65	80
Melhus	05.08.	90	0	0	85
Kvithamar	21.07.	10	15	40	70
Værnes	08.08.	75	5	20	85
Hegra	01.08.	65	15	35	80
Overhalla	11.08.	20	20	30	85

Forskning i Tyskland påviste at sopp *R. collo-cygni* produserer fargerike toksiner (alkaloider) som aktiveres ved hjelp av lys (Heiser *et al.* 2003, 2004; Miethbauer *et al.* 2003). Dette arbeidet har økt forståelsen av sykdommen betraktelig. Toksinene produsert av sopp viste seg hovedsakelig å være rubellin B og D. Rubellin-typen på byggblad viste seg å være rubellin B som er uløselig i planten (2-6 µg/m² bladareal). Rubellin D er den løselige varianten. Begge typer rubellin (B og D) aktiveres ved hjelp av lys og kan oksidere umettete fettsyrer i plantevevet. Rubelliner er generelle toksiner, og deres betydning for infeksjonsprosessen er usikker.



Figur 1. Spragleflekk på bygg.



Figur 2. Spragleflekk på havre.



Figur 3. spragleflekk på kveke.

typiske flekker bare på bladrand og bladspisser). I testen i april-mai 2005 brukte vi Nær UV-lys ("black light", 36 W/m^2) i tillegg til kunstig lys (høytrykk natrium lamper, 32 W/m^2). Tre vanlige byggsorter ble valgt: Gaute, Thule og Lavrans. Kornet ble sådd i 12 cm potter (5 frø/potte). Forsøksplanen var en fullstendig randomisert plan med 3 sorter, 2 behandlinger (smittet, ikke smittet) og 4 gjentak. Temperaturen var $22 \text{ }^\circ\text{C}$ om dagen og $10 \text{ }^\circ\text{C}$ om natten. Behandla forsøksledd ble smittet med en kombinasjon av sporer og hyfer fra 6 isolat av *R. collo-cygni*, 4 uker etter såing. Plantene ble da dekket med klarplast i 3 døgn. Det ble gjennomført tre registreringer: ved BBCH 50, 55 og 70. Veksthusgulv ble spylet med vann på ettermiddager for å øke utvikling av dogg på bladverket.

Resultat

Typiske spragleflekkssymptom ble registrert ca to uker etter smitting, dette bare på Lavrans. Angrepsnivået på Lavrans var ved stadiet 70 (BBCH), 40 %. Thule hadde lite sykdom (maks 5 %). Det var derimot veldig vanskelig å finne noe spragleflekk på Gaute. Symptomer på Lavrans var helt lik symptomer på friland (figur 4). Ved senere stadier ble blad på Lavrans hvitaktig og inntørket. Generelt ble det mindre sykdom enn friland. Vi har registrert spragleflekk på Gaute opp mot 7 % på friland.

Vi prøvde å isolere soppen fra alle tre sortene. Det viste seg at *R. collo-cygni* var etablert i alle tre både i blad og stengelen. Dette tilsier at soppen kan eksistere symptomfri for en lengre periode i enkelte byggsorter.

Kunstig inokulering i veksthus Kort om materialer og metoder

Vi ønsket å utvikle en testmetode for "screening" av foredlingsmaterial av bygg for resistens mot spragleflekk. Vi hadde en lignende test tidligere der utvikling av symptomer ikke var tilfredsstillende (fikk



Figur 4. Symptomer av spragleflekk utviklet ved kunstig smitte i veksthus. Planten til venstre er ikke smittet. Planten til høyre er smittet med 6 isolat av spragleflekkssoppen.

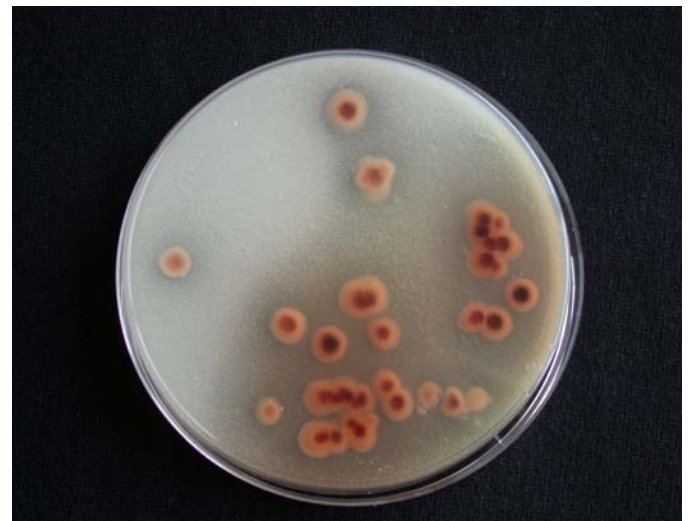
Studie av R. collo-cygni biologi

Det ble isolert over 200 isolat fra bygg og 30 fra havre. Isolat fra kveke var sterkt infisert med saprofytter og ble derfor kastet. Vi så på kulturegenskaper på forskjellige agartyper og vekstforhold.

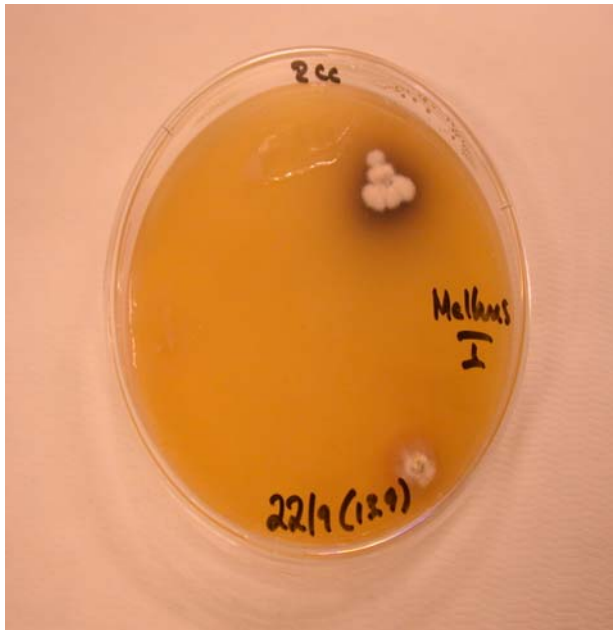
Resultat

Soppen danner mange sporer bare 6-7 dager etter vekst på grønnsak-agar. Forutsetningen er at skåler skal plasseres i klimaskap med både lysrør og "black light" (NUVL). Temperaturen skal være 20 °C ved belysning

(16 t) og 12 °C i mørkeperioden (8 timer). Kulturens farge er sterk avhengig av vekstmediet den er dyrket på. F. eks. er den hvit-gul på grønnsak-agar, rosa på agar med bygghalm og fiolett på agar laget fra avkok av byggblad. Dette har trolig med produksjon av rubelliner å gjøre siden de har forskjellige farge. Vi fant at produksjon av rødlig / fiolette fargestoffer øker i konkurranse om mat (flere kolonier på samme skål, figur 5), mot inntrengere, f. eks. bakterier i skålen (figur 6), og også når kolonier blir utsatt for sollys (skåler satt ved vinduskarmen, figur 7). Det er også variasjon i produksjon av løselige fargestoff i isolatene: noen lager slike metabolitter helt fra starten av (figur 8). Vi tror soppen lager rubelliner i stressende situasjoner.



Figur 5. *Ramularia collo-cygni* produserer rubellin (rødt) i konkurranse om mat.



Figur 6. *Ramularia collo-cygni* produserer flytende fargestoffer mot en konkurrerende bakteriekoloni.

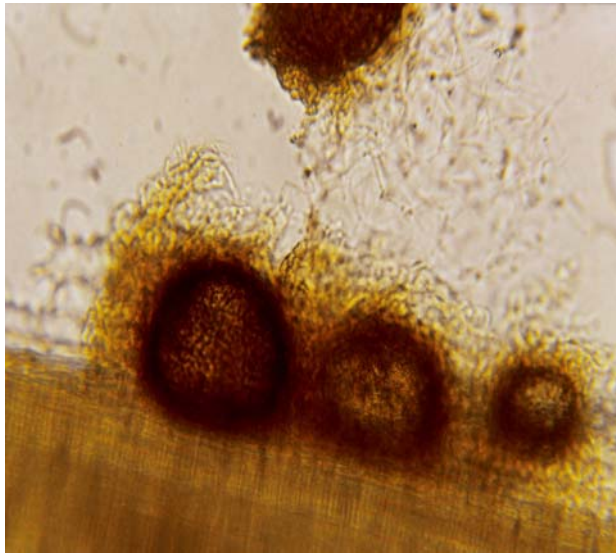


Figur 7. Soppen *Ramularia collo-cygni* produserer fargestoffer i vekstmediet ved sollys (vekstmediet blir mørk fiolett).



Figur 8. Genetisk variasjon i produksjon av fargestoffer mellom isolat av *Ramularia collo-cygni*. Skålene er podet samtidig. Øverste rad viser undersiden av koloniene.

Ramularia collo-cygni også en *Astromella*
På noen gamle kulturer av soppen (6 mnd, ved 4 °C) fant vi brune små kuleformete pyknidie-lignende organer rundt koloniene, noen synlige med bare øyet. Vi autoklaverte bygghalm og la inn i kulturene. Soppen laget slike organer også utenpå og inne i bygghalm (figur 9). Vi hadde ikke sett slike organer i våre *Ramularia*-kulturer tidligere. Seks skåler med soppen ble det sendt til Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) i Nederland. Der konstaterte de at disse var kalt "sporangia" og er "hann-stadiet" til soppen og at dette stadiet heter *Astromella*. *Astromella* er et mellomstadium for sopper som har sitt kjønna stadium i slekten *Mycosphaerella*. Dette stadiet er ikke funnet på agar tidligere. Braun (2002) rapporterte fra en publikasjon i Argentina om funn av dette stadiet på blad av bygg med spragleflekkssymptomer. Dette funnet øker sannsynligheten for forekomst av det kjønna stadiet av soppen i naturen og dermed årsak til økt genetisk variasjon.



Figur 9. Sporangia av soppen *Ramularia collo-cygni* (stadiet *Astromella*) utviklet på autoklavert bygghalm plassert på kulturer dyrket på grønnsak-agar.

Smittekilder, smittebetingelser

Studie av historiske værdata og deres relasjon til etablering av spragleflekk (Salamati, 2003) viste at fuktige værforhold i de to første ukene i juni legger til rette for etablering av spragleflekk. I 2005 hadde vi data for sykdommen fra forskjellige steder i Midt-Norge, og samme trend ble registrert. Sammenhengen mellom varighet for bladfuktighet og antall dager med nedbør i denne perioden (de første 15 dagene i juni) og det endelige sykdomsnivået ble studert for værstasjonen Kvithamar for årene 2000 til 2006.

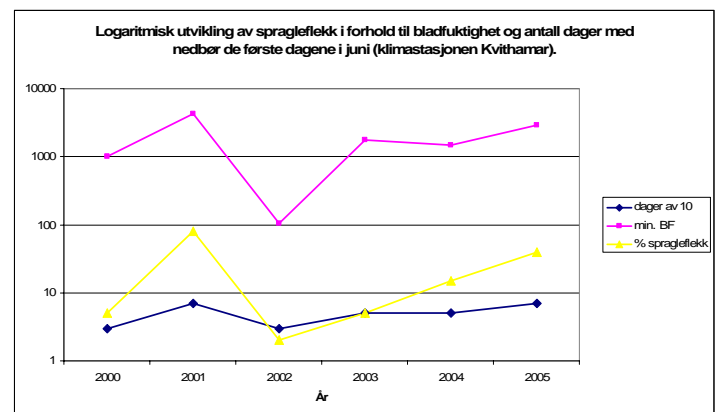
Resultat

Etter en nærmere analyse av sammenhengen mellom fuktighet-faktorer og spragleflekk viste det seg at de første 10 dagene i juni hadde størst betydning. Tabell 2 viser sykdomsnivået i de seks årene i forhold til fuktighet-faktorer i denne perioden.

Tabell 2. Historiske data for nedbør og bladfuktighet de første 10 dagene i juni i relasjon til spragleflekk.

År	dager av 10 med nedbør	min. BF	% spragleflekk
2000	3	1000	5
2001	7	4300	80
2002	3	105	2
2003	5	1763	5
2004	5	1463	15
2005	7	2918	40

En logaritmisk sammenheng mellom faktorene bekrefter at den endelig angrepsnivået av spragleflekk er sterkt avhengig av lange perioder med fuktighet tidlig i sesongen (figur 10).



Figur 10. Fuktige værforhold de første dagene i juni er avgjørende for etablering av soppen og dermed et sterkt angrep av spragleflekk.

Dette tilsier at sykdommen starter tidlig (BBCH 15-30). Det er ikke lett å finne spragleflekk tidlig i sesongen. En hovedgrunn er at sykdommen kommer snikende. Først blir noen få blad smittet. Smittebilde er også ganske forskjellige i begynnelsen (figur 11 og 12). Det starter med få store flekker på ca 3-5 mm lengde og ca 2-3 mm bredde. Noen av flekkene ligner på bokstaven "H". Senere visner de fleste angrepne blad og soppen er da latent til kornet kommer til den generative fasen.



Figur 11. Spragleflekk starter snikende med noen få store flekker (stadiet BBCH 15-30).



Figur 12. Spragleflekk på eldre byggblad. Flekkene er få og store.

Smittekilder

Studier i New Zealand har vist at frøsmitte kan være viktig i spredning og etablering av sopp. Harvey fant (2002) opp til 10 % frøsmitte i noen kornpartier. Sporer av *R. collo-cygni* er ca 1/10 av sporer til melduggsoppen (*Blumeria graminis*). Meldugg sporer er godtegnede til lufttransport. I tillegg til at sporer til spragleflekk sopp er små, er de utrustet med pigger som kan festes til andre luftpartikler. I Norge har vi isolert sopp både fra havre, kveke og bygg. Morfologisk er ikke isolatene forskjellig fra hverandre. Vi skal undersøke om isolat fra bygg kan infiserer havre, kveke og omvendt. Huss *et al.* (2005) konkluderte med at smitte til havre i Østerrike hadde sin opprinnelse i bygg. Mulige smittekilder for spragleflekk er oppsummert i figur 13.

- Frøsmitte
- Selvsådde planter etter høsting
- Luftbårne sporer (også over lange avstander)
- Kveke og andre grasarter?
- Kjønnne sporer?



Bygg

Figur 13. Mulige smittekilder for spragleflekk.

Hvorfor ble angrepene av spragleflekk alvorlig fra 1980-årene?

Soppen var først rapportert på bygg i Italia i 1893 (Cavara). Senere fant Jørstad den på byggprøver fra Midt-Norge (1930). Han konkluderte med at *R. collo-cygni* var en saprofyt. Først i 1987 (Huss *et al.*) ble den konstatert i Europa som årsak til spragleflekk, altså 57 år senere. Flere egenskaper til *R. collo-cygni* ligner på egenskaper til en gruppe sopp som kalles endofytter. De er som regel ikke-parasittære sopp som lever i planten. Det spekuleres om at de bør ha noe nytte for planten siden deres vekst ikke hindres av diverse resistensmekanismer i planten. Alle planter har slike sopper. Spesielt vanlig er de i grasarter. Tabell 3 sammenligner *R. collo-cygni* og grå øyeflekk-soppen *Rhynchosporium secalis* med hensyn til noen vanlige endofytiske egenskaper.

Tabell 3. Sammenligning av spragleflekk-soppen og grå øyeflekk-soppen i forhold til noen typiske egenskaper av endofyttisk sopp.

Endofytter	<i>R. collo-cygni</i>	<i>R. secalis</i>
Vokser intercellulært i planten	✓ ^a	- ^b
Kan infisere forskjellige planteslag	✓	-
Er ofte involvert i nedbryting av dødt plantemateriale	✓ ^c	-
Utfordrer ikke resistansmekanismer i planten	✓	-
Kan være latent i lange perioder	✓	-
Sporulerer når planten er gammelt og vissent	✓	-
Produserer ofte toksiske metabolitter	✓	-

^{a)} Sutton & Waller, 1998.

^{b)} Xi *et al.*, 2000.

^{c)} Salamati *et al.*, 2002.

Forholdet mellom bygg og spragleflekk-soppen er komplisert og gammelt. Vår teori er at *R. collo-cygni* er en endofyttisk sopp som har levd i assosiasjon med bygg i tusener av år. Det er påvist at lyset har stor betydning for utvikling av skade på bygg (p.g.a. rubelliner, kanskje en fortykning av osonlaget kan ha ført til større produksjon av rubellin i planten og dermed merkbar skade hos byggplanten). Vi har vist at soppen danner rubelliner i stressede situasjoner. Spragleflekk er mer problematisk på sorter med resistensen mot andre byggsykdommer. Slike sorter stresses fortere av biotiske eller miljømessige faktorer enn andre byggsorter. Når planten stresses, blir også *R. collo-cygni* stresset. Dette kan ha ført til seleksjon av isolat som er mer følsomme og produserer større, farlige mengder av rubellin. Siden *R. collo-cygni* ikke har de typiske patogene egenskaper, taper den ofte konkurransen med typiske byggsoppatogener f. eks. *Rhynchosporium secalis* (grå øyeflekk-soppen), *Pyrenophora teres* (byggbrunflekk-soppen) og *Blumeria graminis* (meldugg-soppen). Bedre bekjempelse av disse konkurrentene i de siste årene kan også ha bidratt til økning av spragleflekk.

Etterord

Vi ønsker å takke Marika Nyman for presist og dyktig teknisk arbeid. Vi setter også stor pris på økonomisk støtte fra private og lokale myndigheter i Sør- og Nord-Trøndelag til dette arbeidet. Bioforsk sitt varslingsprogram, VIPS, har også bidratt økonomisk til prosjektet.

Referanser

Braun U. 2002. *Ramularia collo-cygni* (*Ramularia* leaf blight of barley): Taxonomy and phylogeny. Proceeding of the 2nd International Workshop on Barley Leaf Blights. ICARDA-Aleppo, April 7-11, 2002:370-375.

Harvey, I. C. 2002. Epidemiology and control of leaf and awn spot of barley caused by *Ramularia collo-cygni*. New Zealand plant protection 55: 331-335. www.hortnet.co.nz/publications/nzpps.

Havis N. D. ; Piper S. R. ; Oxley S. J. P. & Langrell, S. R. H. 2002. Development of a PCR based identification and detection assay for *Ramularia collo-cygni* direct from barley leaf tissue. Proceeding of the 2nd International Workshop on Barley Leaf Blights. ICARDA-Aleppo, April 7-11, 2002:343-350.

Heiser, I.;Sachs, E. & Liebermann, B. 2003. Phytodynamic oxygen activation by rubellin D, a phytotoxin produced by *Ramularia collo-cygni*. Physiological and Molecular Plant Pathology 62:29-36.

Heiser, I., Hess M., Schmidke K.-U., Volger U., Miethbauer S. & Liebermann B, 2004. Fatty acid peroxidation by rubellin B, C and D, phytotoxins produced by *Ramularia collo-cygni*. Physiol. & Molecul. Plant Pathol. 64 (3): 135-143.

Huss, H.; Mayerhofer, H. & Wetschnig, W. 1987. *Ophiocladium hordei* CAV. (Fungi imperfecti), ein für Österreich neuer parasitischer Pilz der Gerste. - Der Pflanzenarzt 40: 167-169.

Huss, H. 2002. The biology of *Ramularia collo-cygni*. Proceeding of the 2nd International Workshop on Barley Leaf Blights. ICARDA-Aleppo, April 7-11, 2002:321-328.

Huss, H.; Miethbauer, S. & Liebermann, B. 2005. Eine ernstzunehmende Krankheit auch bei Hafer und Weizen: Weitere Ausbreitung

der Sprenkelkrankheit. Der Pflanzenarzt (9-10): 8-10.

Miethbauer, S. ; Heiser, I. & Liebermann, B. 2003. The phytopathogenic fungus *Ramularia collo-cygni* produces biologically active rubellins on infected barley leaves. Journal of Phytopathology 151 (11-12):665-668.

Salamati, S. ; Reitan, L. & Flataker K. E. 2002. Occurrence of *Ramularia collo-cygni* on spring barley in Norway. Proceeding of the 2nd International Workshop on Barley Leaf Blights. ICARDA-Aleppo, April 7-11, 2002: 355-359.

Salamati S. 2003. Spragleflekk - hva vet vi nå? Grønn kunnskap 7 (3): 216-227.

Sutton, B. & Waller, J. M. 1988. Taxonomy of *Ophiocladium hordei*, causing leaf lesions on Triticale and other Gramineae. Trans. Br. Mycol. Soc. 90, 55-61.

Xi, K. ; Burnett, P. A ; Tewari, J. P. ; Chen, M. H. Turkington, T. K. & Helm, J. H. 2000. Histopathological study of barley cultivars resistant and susceptible to *Rhynchosporium secalis*. Phytopathology 90: 94-102.