

Funn av soppmiddel-resistent *Botrytis* i åkerbønne

Heidi Udnes Aamot, Silje Kvist Simonsen, Magne Skårn, Katherine A. G. Nielsen, Birgitte Henriksen & Guro Brodal

NIBIO Plantehelse

heidi.udnes.aamot@nibio.no

Innledning

Økt produksjon av åkerbønner i Norge er ønskelig av mange grunner. I tillegg til krav om lang vekstsesong, er sjukdomsangrep en begrensende faktor i åkerbønnedyrkinga. Sjokoladeflekk er en sjukdom forårsaka av ulike arter innen soppselekt *Botrytis*, og kan gi betydelige avlingskader, både i form av redusert avlingsmengde og -kvalitet. Dette bidrar til en økonomisk risiko ved dyrking av åkerbønne. Sjukdommen er vanlig på åkerbønne i Norge (Sundheim 1973; Øverland *et al.* 2009), og utvikler seg raskt under sjukdomsfremmende forhold (fuktig vær med temperaturer over 10-15°C) som mørkebrune flekker på blader, stengler, i blomster og på belger (bilde 1). De største avlingstapene er knyttet til angrep i blomster, som i sin tur ødelegger utvikling av belgene. I sesonger med mye regn i blomstringsperioden er det i Norge observert store avlingstap som følge av sjokoladeflekkangrep. Nye, tidlige åkerbønnesorter med akseptabelt avlingspotensiale er på vei inn på markedet i Norge, og gir økte muligheter for norsk åkerbønneproduksjon, men disse sortene blir imidlertid lett angrepet av sjokoladeflekk (Abrahamsen & Waalen 2020). For å sikre gode avlinger ved økt dyrkingsomfang av åkerbønner er det nødvendig med effektive planteverniltak for bekjemping av sjokoladeflekk.

Artene *Botrytis fabae* og *Botrytis cinerea* er kjent som vanlige årsaker til sjokoladeflekk på åkerbønne (Harrison 1988), også i Norge (Sundheim 1973). Nylig har det blitt rapportert om funn av ytterligere to arter som kan gjøre skade i åkerbønne: *Botrytis fabiopsis* (Zhang *et al.* 2010) og *Botrytis pseudocinerea* (Plesken *et al.* 2015). Det finnes ingen nyere kartlegging av hvilke arter som er årsak til sjokoladeflekk i åkerbønner i Norge. De ulike artene har ulike potensialer for å gi sjukdomsutvikling i åkerbønne og for å utvikle resistens mot soppmidler (Plesken *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2010). Artenes biologi varierer også, de har bla. ulike vertsplantesperter (Harrison 1988). Dette

har betydning for hvilke agronomiske tiltak som vil kunne redusere smittepress. Det er derfor nødvendig med oppdatert kunnskap om hvilke arter som forårsaker sjokoladeflekk i åkerbønner i Norge, og det må vurderes hvor godt vi kjenner til biologien til de observerte skadegjørerne under norske forhold.

Strategier for integrert plantevern (IPV) innebærer at det ikke dyrkes åkerbønner på samme areal oftere enn hvert 6-7 år. Åkerbønne dyrkes vanligvis etter pløying som begraver smitta planterester, og med effektiv ugras-bekjempelse (ugras kan være vertsplanter for soppjukdommer og dermed opprettholde smitte). Til tross for dette er angrep av sjokoladeflekk stadig en utfordring, og sprøyting med soppmidler regnes ofte som nødvendig (Øverland & Abrahamsen 2009). I Norge har forsøk med soppmiddel ofte gitt betydelige meravlinger (20-30 %), men også moderat eller ingen endring i avlingsmengde er observert etter sprøyting (Øverland *et al.* 2009; Abrahamsen & Brodal 2014). I noen tilfeller har det vært registrert betydelige angrep av sjokoladeflekk også etter behandling med soppmidler. Det er ikke kjent om dette skyldes feil sprøytetidspunkt eller om soppmidlene ikke virker som forventet.

Det er pr. i dag et begrensa utvalg av soppmidler som er tillatt for bruk i åkerbønne i Norge. *Botrytis* som forårsaker gråskimmel i frukt og bær har vist stor grad av resistens mot flere av virkestoffene i disse soppmidlene i Norge (Nielsen *et al.* 2022; Johansen *et al.* 2017; Johansen *et al.* 2019). Videre er det på verdensbasis rapportert at flere arter av *Botrytis* som forårsaker sjukdom i ulike kulturer har stor evne til å utvikle soppmiddel-resistens (FRAC 2019). Det mangler data om effekten av ulike soppmidler på *Botrytis*-arter fra åkerbønne, inkludert *B. fabae* sin evne til eventuelt å utvikle soppmiddel-resistens.

God plantehelse er viktig for at åkerbønnedyrking skal være attraktivt og lønnsomt. I forprosjektet «Sjokoladeflekk i åkerbønne – sjukdomsorganismer



Bilde 1. Angrep av sjokoladeflekk i åkerbønne.
Foto: Unni Abrahamsen.

og risiko for fungicidresistens» finansiert av Forskningsmidlene for jordbruk og matindustri (FFL/JA), har vi kartlagt hvilke arter av *Botrytis* som forårsaker sjokoladeflekk i åkerbønne på to lokaliteter, og undersøkt soppmiddel-resistens hos disse. Arbeidet legger til rette for videre utvikling av effektive og bærekraftige strategier for IPV, med minimert bruk av soppmidler og minst mulig risiko for oppbygging av soppmiddel-resistens hos sjukdomsorganismene.

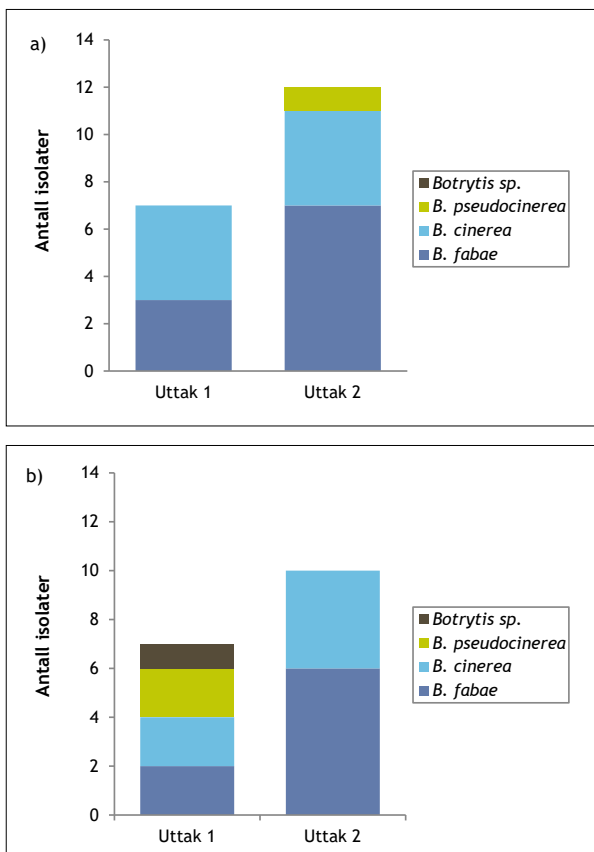
Kartleggingsarbeid

Gjennom sesongen 2021 ble det samla inn åkerbønneplanter med sjokoladeflekk-symptomer fra to forsøksfelt (Ås og Sarpsborg) som var sprøytet mot soppjukdom med preparatet Signum (boskalid + pyraklostrobin) 1-2 ganger gjennom sesongen. Plantene ble samla inn ved to tidspunkt, i starten av blomstringa og nærmere innhøsting (hhv. før og ei tid etter sprøyting). *Botrytis* ble isolert fra overgangen mellom sjukt og friskt plantevev ved å legge ut overflatedesinfiserte vevsbiter på et vekstmedium for sopp (PDA). Soppvekst ble registrert og kolonier av *Botrytis* identifisert basert på de morfologiske egenskapene til mycel, sporer- og sporebærere og sklerotier. I tillegg ble noen isolater laga ved å ta sporer direkte fra plantemateriale med sporulerende *Botrytis*. Et utvalg av isolatene ble lagra i NIBIO sin referansesamling over planteskadegjørere som enkeltsporeisolat. Disse ble analysert videre (artsidentifisering, soppmiddel-resistens).

Funn av tre ulike *Botrytis*-arter i åkerbønne i Norge

Isolatene ble bestemt til art ved å sekvensere deler av *nep2* genen [som beskrevet i Nielsen *et al.* (2022)], som er vist å kunne skille mellom arter av *Botrytis*. I begge forsøksfeltene dominerte *B. cinerea* og *B. fabae* (figur 1). Begge artene ble isolert fra vevsprøver fra planter med ulike typer sjokoladeflekk-symptomer (tabell 1), noe som indikerer at begge artene kan forårsake lignende symptomer og sjukdomsforløp. I tillegg ble *B. cinerea* isolert direkte fra sporer på sjukt plantemateriale. Funna våre er i samsvar med observasjonene til Sundheim (1973), som også isolerte *B. cinerea* og *B. fabae* fra ulike typer sjokoladeflekk-symptomer på åkerbønne dyrka i Norge.

I tillegg til *B. cinerea* og *B. fabae*, ble *B. pseudocinerea* påvist i begge forsøksfeltene. Dette er første gang *B. pseudocinerea* påvises i åkerbønne i Norge. Arten ble relativt nylig oppdaget i åkerbønne i Tyskland (Plesken *et al.* 2015) og Latvia (Bankina *et al.* 2021). Forsøk har vist at *B. pseudocinerea* i inokuleringstester på avkutta blader kan gi symptomer på lik linje med *B. cinerea* og *B. fabae* (Bankina *et al.* 2021). En fjerde art, *B. fabiopsis* kan også forårsake sjokoladeflekk i åkerbønne (Zhang *et al.* 2010; Bankina *et al.* 2021), men denne arten ble ikke observert i kartlegginga vår. Man kan derimot ikke utelukke at arten finnes i Norge. *Botrytis* kan trolig smitte via frø (Harrison 1988), og dersom såvare av åkerbønne importeres til Norge fra land hvor alle de fire *Botrytis*-artene forekommer, øker sannsynligheten for at disse kan introduseres til Norge. Sundheim (1973) (og flere andre) har vist at *B. fabae* er mer aggressiv enn *B. cinerea*, men få har sammenligna aggressiviteten til alle de fire artene og evt. samspill mellom dem. Det arbeidet som er gjort på dette har kommet til ulike konklusjoner, og det trengs ytterligere studier for å klarlegge rollen til de ulike artene i utvikling av sjokoladeflekk i åkerbønner (Bankina *et al.* 2021; Zhang *et al.* 2010). Så langt vi vet, er det heller ikke kjent om ulike åkerbønnesorter er like mottagelige for de ulike *Botrytis*-artene (viktig ved foredling for sjukdoms-resistens i åkerbønne). I tillegg til evnen til å utvikle sjukdom, vil det være viktig med videre studier for å se på andre egenskaper som kan variere mellom artene, deriblant overlevelsessevne og evnen til å utvikle resistens mot soppmidler. Dette er informasjon som er viktig for å kunne utvikle effektive IPV- strategier for bekjempelse av sjokoladeflekk i åkerbønne.



Figur 1. Antall isolater av *Botrytis*-arter isolert fra planter med sjokoladeflekk i åkerbønnefelt i Sarpsborg (a) og Ås (b). Plantene ble tatt ut rundt blomstring (uttak 1) og nærmere høsting (uttak 2) i vekstsesongen i 2021. For tre av isolatene må art bekrefte (ett som kun er identifisert som *Botrytis sp.* og to som foreløpig er identifisert som *B. cinerea*).

Testing av *Botrytis*-isolater fra åkerbønne for soppmiddel-resistens

Botrytis-isolater fra Ås ble testet for resistens mot boskalid og pyraklostrobin, de to virksomme stoffene i soppmiddelet Signum. Boskalid er et soppmiddel av typen SDHI («succinate dehydrogenase inhibitor») som tilhører FRAC-gruppe 7, og pyraklostrobin er av typen QoI («quinone outside inhibitor») som tilhører FRAC-gruppe 11 (FRAC 2022). Resistens ble testet ved å måle soppens evne til å vokse i vekstmedium tilsatt ulike konsentrasjoner av de virksomme stoffene.

Botrytis-isolater isolert fra feltet i Ås før sprøyting/ rundt blomstring (*B. fabae*, n=2; *B. cinerea*, n=2; *B. pseudocinerea*, n=2 og *Botrytis sp.*, n=1) viste svært liten eller ingen vekst ved de høyeste konsentrasjonene av både boskalid og pyraklostrobin, og ble derfor regna som sensitive (tabell 2). Typiske vekstmålinger for disse isolatene er vist i figur 2. *Botrytis* isolert fra planter tatt ut nærmere høsting (dvs. en tid etter sprøyting) viste varierende respons på boskalid og pyraklostrobin. De fire *B. fabae* som var isolert på dette tidspunktet vokste ved alle konsentrasjonene av boskalid, selv om veksten var noe hemmet ved de høyere konsentrasjonene. Foreløpig analyse kan tyde på at disse isolatene har opp til moderat resistens mot boskalid. De samme isolatene var sensitive for pyraklostrobin. Typiske vekstmålinger for disse isolatene er vist i figur 3. Graden av veksthemming ved boskalid sammenligna med kontroll (uten soppmiddel) varierte noe mellom isolatene. Alle de fire *B. cinerea*-isolatene som var isolert etter sprøyting vokste godt ved alle konsentrasjoner av pyraklostrobin. Tre av isolatene vokste også godt ved alle konsentrasjoner av boskalid, og ble dermed regna som resistente mot begge de virksomme stoffene (eksempel i figur 4). Det fjerde isolatet vokste i liten grad ved den høyeste konsentrasjonen av boskalid, og har antagelig en moderat grad av resistens.

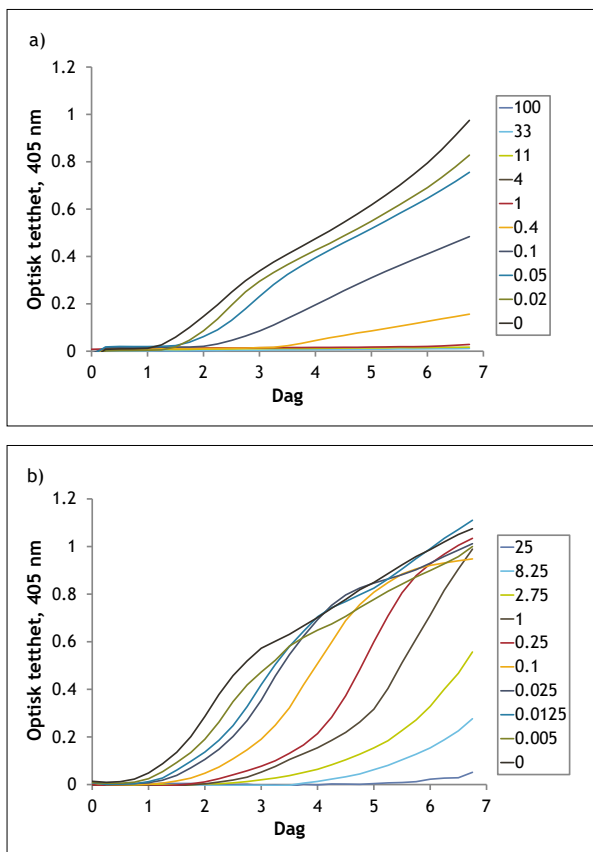
Tabell 1. Arter av *Botrytis* isolert fra ulike typer symptomer på åkerbønne i sesongen 2021

Type symptom	Antall isolater av		
	<i>B. fabae</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>B. pseudocinerea</i>
Sporer ¹⁾		6	1
Små flekker (vev) ²⁾	11	5	
Større flekker (vev) ²⁾	7	3	
Flekker (vev) ^{2), 3)}			2

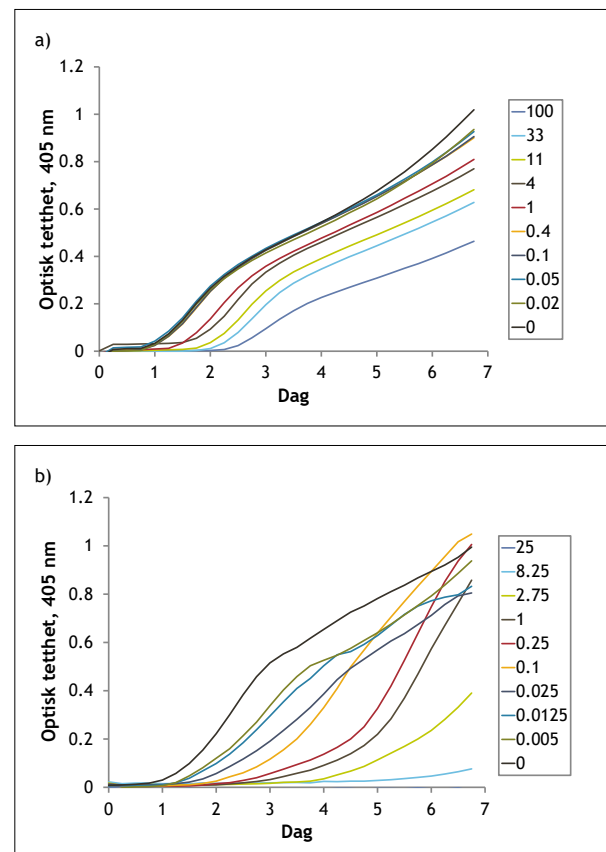
¹⁾ Isolerte sporer direkte fra plantemateriale

²⁾ Isolert fra kulturer som vokste fra overflatedesinfisert vev lagt ut på vekstmedium

³⁾ Ingen data om størrelse/type flekk



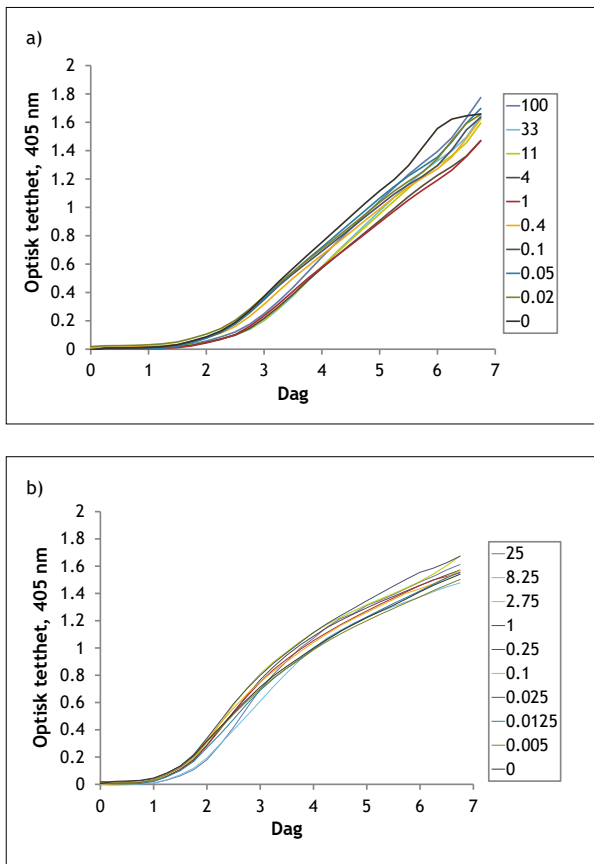
Figur 2. Vekst av et *Botrytis fabae* isolat (202 948) fra åkerbønne ved ulike konsentrasjoner (mg/L) av boskalid (a) og pyraklostrobin (b). Veksten ble målt som optisk tetthet ved 405 nm over tid. Isolattet kommer fra planter tatt ut før sprøyting (fra forsøksfeltet i Ås).



Figur 3. Vekst av et *Botrytis fabae* isolat (202 974) fra åkerbønne ved ulike konsentrasjoner (mg/L) av boskalid (a) og pyraclostrobin (b). Vekst ble målt som optisk tetthet ved 405 nm over tid. Isolattet kommer fra planter tatt ut en tid etter sprøyting (fra forsøksfeltet i Ås).

Våre resultater indikerer at *B. fabae* kan ha evne til å utvikle moderat resistens mot boskalid. Av *B. fabae*-isolatene som ble testet ble det ikke observert resistens mot pyraclostrobin. Flere av de testa *B. cinerea*-isolatene var resistente mot både boskalid og pyraclostrobin. Det er tidligere rapportert om noe resistens blant *B. cinerea* fra et åkerbønnefelt i Tyskland (Plesken *et al.* 2015), men soppmiddelresistens hos *Botrytis* i åkerbønne er ellers lite studert. Dette kan skyldes at plantene er ettårige, og gjentatte sprøytinger er mindre vanlig. *Botrytis cinerea* har et vidt vertplantespekter og finnes praktisk talt over alt. Arten er klassifisert som et høyrisiko-patogen for utvikling av soppmiddel-resistens (FRAC 2019), og den har i mange tilfeller blitt påvist å være resistent mot virksomme stoffer fra ulike kjemiske grupper (Nielsen *et al.* 2022; Plesken *et al.* 2015). Dermed vil populasjoner av *B. cinerea* som blir utsatt for behandlinger med soppmidler i andre kulturer kunne utvikle resistens og utgjøre en risiko for åkerbønnefelt i nærheten. Resultatene våre tyder på

at soppmiddel-resistens er noe som må håndteres nøye i åkerbønneproduksjonen. Bruk av soppmidler mot andre sykdommer i åkerbønne vil kunne bidra til seleksjon for soppmiddelresistens hos *Botrytis*-populasjoner i åkerbønnefelt. For eksempel brukes Amistar, som inneholder azoxystrobin (QoI, FRAC-gruppe 11), i åkerbønne, hovedsakelig mot bønnebladflekk forårsaket av *Ascochyta*. Signum og Amistar inneholder begge soppmidler i FRAC-gruppe 11, hvor det finnes kryssresistens. Dette betyr at bruk av Amistar vil øke risikoen for at *Botrytis* kan bli resistent mot pyraclostrobin i Signum. Forskrift om såvare (<https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/1999-09-13-1052>) stiller ingen spesifikke krav til frøhelse i belgvekster, og ingen beisemidler er tillatt brukt i åkerbønne i Norge. I praksis betyr dette at ubeisa frø med ukjent helsestatus kan bli omsatt og brukt i Norge, og det kan ikke utelukkes at frøpartier med soppmiddel-resistent *Botrytis* kan forekomme, spesielt dersom soppmidler benyttes gjentatte ganger i frøproduksjonen.



Figur 4. Vekst av et *Botrytis cinerea* isolat (202 968) fra åkerbønne ved ulike konsentrasjoner (mg/L) av boskalid (a) og pyraklostrobin (b). Vekst ble målt som optisk tetthet ved 405 nm over tid. Isolatet kommer fra planter tatt ut en tid etter sprøyting (fra forsøksfeltet i Ås).

Oppsummering

Dette er første gang *B. pseudocinerea* er påvist i åkerbønner dyrka i Norge. Resultatene viser også at *Botrytis cinerea* og *B. fabae* ser ut til å forekomme om lag like hyppig. Siden resultatene er begrensa til to felt og en sesong, vil kartlegging over flere år og områder være viktig for å få bedre innblikk i hvilke arter som forårsaker sjokoladeflekk i åkerbønner i Norge. Vi gjorde også funn av soppmiddel-resistent *Botrytis*, der noen av isolatene viste resistens mot begge virkestoffene i det mest brukte soppmiddelet i åkerbønne. Disse funna tyder på at soppmiddel-resistens bør overvåkes videre, for å få mer informasjon om hvor hyppig resistensen forekommer i åkerbønne. Mekanismene bak resistensen og den praktiske betydningen bør også undersøkes. Dette er kunnskap som er viktig for å kunne forutsi hvorvidt behandling med soppmidler kan forventes å gi tilstrekkelig effekt. I tillegg bør

Tabell 2. Isolater av *Botrytis* som er isolert fra åkerbønne i Ås og testa for respons mot boskalid og pyraclostrobin (dvs. virkestoffene i preparatet Signum, det mest brukte soppmidlet i åkerbønne)

Isolat ¹⁾	Uttak ²⁾	Art	Respons mot boskalid ³⁾	Høyeste kons. (mg/L) av boskalid med liten/ingen soppvekst ⁴⁾	Respons mot pyraklostrobin ³⁾	Høyeste kons. (mg/L) av pyraklostrobin med liten/ingen soppvekst ⁴⁾
202962	1	<i>Botrytis</i> sp.	S	1	S	2,75
202949	1	<i>B. cinerea</i>	S	0,4	S	8,25
202964	1	<i>B. cinerea</i>	S	1	S	2,75
202948	1	<i>B. fabae</i>	S	0,4	S	25
202950	1	<i>B. fabae</i>	S	1	S	25
202946	1	<i>B. pseudocinerea</i>	S	0,4	S	2,75
202961	1	<i>B. pseudocinerea</i>	S	1	S	8,25
202965	2	<i>B. cinerea</i> ?	LR	100	R	(x)
202968	2	<i>B. cinerea</i> ?	R	(x) ⁵⁾	R	(x)
202966	2	<i>B. cinerea</i>	R	(x)	R	(x)
202969	2	<i>B. cinerea</i>	R	(x)	R	(x)
202972	2	<i>B. fabae</i>	LR	(x)	S	2,75
202974	2	<i>B. fabae</i>	LR	(x)	S	2,75
202975	2	<i>B. fabae</i>	LR	(x)	S	8,25
202973	2	<i>B. fabae</i>	LR	(x)	S	8,25

1) Isolat nummer i NIBIO sin referansesamling over planteskadegjørere

2) Uttak 1: Isolert fra planter tatt ut før sprøyting, dvs. rundt blomstring. Uttak 2: Isolert fra planter tatt ut en tid etter sprøyting

3) S=sensitiv, R=resistent, LR=lav/ noe resistent

4) Liten/ingen soppvekst tilsvarende OD<0,2

5) (x): Isolater med vekst (dvs. OD>0,2) ved alle konsentrasjoner av virkestoff

aggressiviteten til de ulike artene studeres og om det finnes samspill mellom ulike sorter av åkerbønne og *Botrytis*-arter i utvikling av sjukdomsangrep. Dette vil være viktig i foredlinga av sjukdomsresistent åkerbønne. I tillegg til kunnskap om effekt av soppmidler, er bedre kunnskap om hvilke forhold som fremmer sjukdomsutvikling viktig for å utvikle gode sprøytestrategier som tar hensyn til når plantene bør behandles for å oppnå best mulig effekt og unngå unødvendig sprøyting. Dette er viktig for å kunne utvikle gode strategier for IPV i åkerbønne.

Sundheim, L. (1973) *Botrytis fabae*, *B. cinerea*, and *Ascochyta fabae* on broad bean (*Vicia faba*) in Norway. *Acta Agriculturae Scandinavica* 23 (1):43-51.

Zhang, J., Wu, M-D., Li, G-Q., Yang, L., Yu, L., Jiang, D-H., Huang, H-C. & Zhuang, W-Y. (2010) *Botrytis fabiopsis*, a new species causing chocolate spot of broad bean in central China. *Mycologia* 102 (5):1114-1126

Øverland, J.I. & Abrahamsen, U. (2009). Sorter av åkerbønner. *Jord- og Plantekultur 2009*. Bioforsk FOKUS, vol 4 (1): 136-139.

Øverland, J.I., Brodal, G. & Abrahamsen, U. (2009) Soppbekjempelse i åkerbønne. *Jord- og Plantekultur 2009*. Bioforsk FOKUS, vol 4 (1): 140-143.

Referanser

Abrahamsen, U. & Brodal, G. (2014) Soppbekjempelse i olje- og proteinvekster. *Jord- og Plantekultur 2014*. Bioforsk FOKUS, vol 9 (1): 186-196.

Abrahamsen, U. & Waalen, W. (2020) Sortsforsøk i åkerbønne. *Jord- og plantekultur 2020*. NIBIO BOK, vol 6 (1): 144-146.

Bankina, B., Stoddard, F.L., Kaneps, J., Brauna-Morzevska, E., Bimsteine, G., Neusa-Luca, I., Roga, A. & Fridmanis, D. (2021) *Botrytis* four species are associated with chocolate spot disease of faba bean in Latvia. *Zemdirbyste-Agriculture* 108 (4): 297-302.

FRAC (2019) PATHOGEN RISK LIST. Fungicide Resistance Action Committee. Retrieved from: <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019.pdf>

FRAC (2022) FRAC Code List ©*2022: Fungal control agents sorted by cross-resistance pattern and mode of action (including coding for FRAC Groups on product labels). Fungicide Resistance Action Committee. Retrieved from: https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2022--final.pdf?sfvrsn=b6024e9a_2

Harrison, J. (1988) The biology of *Botrytis* spp. on *Vicia* beans and chocolate spot disease a review. *Plant Pathology* 37 (2):168-201.

Johansen, N.S., Asalf, B., Eikemo, H., Ficke, A., Herrero, M-L., Hong Le, V., Netland, J., Ringselle, B., Schjøll, A. & Stensvand, A. (2017) Plantevernmidelresistens hos skadegjørere i norske jord- og hagebrukskulturer. Situasjonsrapport, 2017. NIBIO Rapport, vol 3 (150). NIBIO, Ås, Norge.

Johansen, N.S., Nielsen, K.A.G., Ringselle, B., Fajardo, M.B., Gauslå, E., Stensvand, A. & Strømgeng, G. (2019) Plantevernmidelresistens i norske jord- og hagebrukskulturer. Resultater fra kartlegging og overvåking i 2018. NIBIO Rapport, vol 5 (25). NIBIO, Ås, Norge.

Nielsen, K.A.G., Skårn, M.N., Strømgeng, G.M., Brurberg, M.B. & Stensvand, A. (2022) Pervasive fungicide resistance in *Botrytis* from strawberry in Norway: Identification of the grey mould pathogen and mutations. *Plant Pathology* 71 (6):1392-1403.

Plesken, C., Weber, R.W., Rupp, S., Lerach, M. & Hahn, M. (2015) *Botrytis pseudocinerea* is a significant pathogen of several crop plants but susceptible to displacement by fungicide-resistant *B. cinerea* strains. *Applied and environmental microbiology* 81 (20):7048-7056.