

Kartoffelafgiftsfonden

Titel

Screening for SDHI fungicidresistens i *Alternaria solani* og *A. alternata*.

Projektansvarlig og deltagere

Projektleder: Isaac Kwesi Abuley, PostDoc (Aarhus Universitet (AU))

Deltager: Annemarie Fejer Justesen, Seniorforsker (AU), Jens Grønbech Hansen, Forsker (AU), Poul Lassen IT-medarbejder, (AU), Janne Holm Hansen, Laborant (AU) Anne-Pia Lassen, Laborant (AU), Lars Bødker, Landskonsulent (SEGES)

Resume

Formålet med projektet var at udvikle en protokol til screening for SDHI fungicidresistens i *Alternaria solani* og *A. alternata* og at anvende denne til screening for SDHI-resistens i danske isolater. I 2020 blev der indsamlet og isoleret isolater af *Alternaria* spp. fra 190 kartoffelblade med typiske symptomer fra 25 lokaliteter. Alle isolater blev identificeret til *A. solani* ved hjælp af morfologiske karakteristika. Derfor anvendte vi kun specifikke PCR-metoder til detektion af mutationer i SDHI i *A. solani*. Endvidere undersøgte vi yderligere 36 danske *A. solani* isolater indsamlet i 2016. Vi undersøgte for mutationerne, som forårsager H278Y/R i SdhB, H134R/Q i SdhC og D123E og H133R i SdhD. H134R i SdhC blev fundet i 150 isolater i 2020, mens tre isolater havde H278Y i SdhB. Tre isolater indsamlet i 2016 havde H278Y i SdhB og 25 isolater havde H134R i SdhC. Desuden havde to isolater fra 2016 både H278Y og H134R. H278R i SdhB, H134Q i SdhC, og D123E og H133R i SdhD blev ikke fundet. Vores resultater viste, at mutationen, der forårsager H134R, i SdhC er den mest udbredte i Danmark. Andre europæiske undersøgelser har vist, at isolater med denne mutation har moderat til ingen resistens mod SDHI-fungicider, mens isolater med ændringen H278Y i SdhB har minder følsomhed overfor SDHI-fungicider. Det er derfor nødvendigt at undersøge, hvorledes danske isolater med disse mutationer reagerer overfor SDHI fungicider. Denne undersøgelse har givet et første indblik i forekomsten af SDHI fungicid resistens i *A. solani* i Danmark.

Projekts faglige forløb

Baggrund

Kartoffelbladplet, forårsaget af *Alternaria solani* og *A. alternata*, er en alvorlig skadegører i kartofler som kan medføre store udbyttetab, hvis sygdommen ikke bekæmpes. Sygdommen er set hyppigt, især i stivelseskartofler og avlerne sprøjter nu mere målrettet mod kartoffelbladplet end tidligere. Fungicidresistens eller nedsat følsomhed overfor fungicider er et stigende problem i bekæmpelsen af plantesygdomme [1] herunder også kartoffelbladplet.

I Danmark, har vi testet forskellige modeller og strategier for optimal bekæmpelse af kartoffelbladplet. Modellerne og strategiernes effektivitet afhænger af, at der er effektive aktivstoffer eller fungicider til rådighed. Der findes en lang række fungicider til anvendelse i kartofler, men det er kun fire specialprodukter, Amistar (azoxystrobin), Signum (boscalid + pyraclostrobin), Revus Top (difenoconazol + mandipropamid), Narita (difenoconazol) og Propulse (prothioconazol + fluopyram), der har specifik virkning mod kartoffelbladplet. Signum WG har i Danmark været et af de mest brugte og effektive fungicider til bekæmpelse af kartoffelbladplet. Signum WG består af to aktivstoffer, pyraclostrobin (strobiluriner) og boscalid (SDHI). De sidste 3-5 år er der i Europa og Danmark set en øget forekomst af *Alternaria*-typer, der er resistente over for aktivstoffet azoxystrobin (strobiluriner) i Amistar [2-4].

Selvom der er påvist resistens mod strobiluriner i Danmark og andre Europæiske lande, har Signum hidtil virket meget tilfredsstillende, indtil der blev fundet resistens overfor SDHI (boscalid). Fra USA [5, 6], Sverige [3], Tyskland [7] og Belgien [2] er beskrevet en hurtig udvikling af resistens mod boscalid i *Alternaria* i kartofler dyrket i områder med favorable betingelser for sygdommen. Lavere følsomhed i *Alternaria* over for boscalid/SDHI er forårsaget af mutationer i succinatdehydrogenase-genkomplekset (SHD) i mitokondrierne [6].

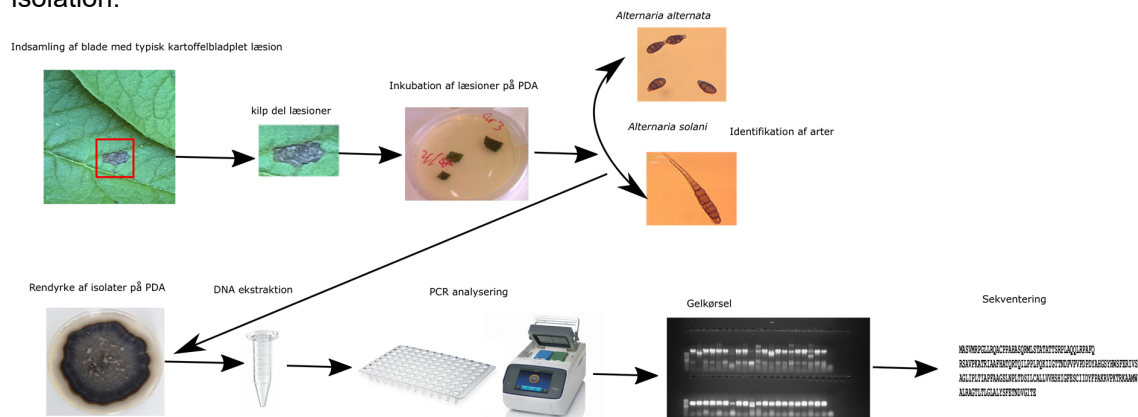
Man har ikke tidligere undersøgt for *Alternaria* boscalid resistens i Danmark, men avlerne har i de seneste år rapporteret, at de har oplevet en mindre effekt med brug af Signum. Det kan skyldes begyndende udbredelse af boscalid-resistente isolater af *A. solani* og derfor, er der et stort behov for at undersøge udbredelsen af boscalid-resistens i danske *Alternaria*-isolater. I det ansøgte projekt har vi: (1) Udviklet en protokol for påvisning af mutationer, der forårsages mindre

Kartoffelafgiftsfonden

følsomhed overfor boscalid i danske isolater af *Alternaria spp.* og (2) Indsamlet og undersøgt danske *A. solani* og *A. alternata* isolater for boscalid resistens.

Metoder

Figur 1 viser en skematisk oversigt over den metode, der blev brugt for indsamling, isolering og PCR-test i projektet. Se appendiks 1 og 2 for videre information om indsamlingsstrategi og isolation.



Figur 1. Skematisk oversigt over strategi for indsamling, isolering og PCR-test af mulige isolater af *Alternaria spp.*

Indsamling af blade med kartoffelbladplet

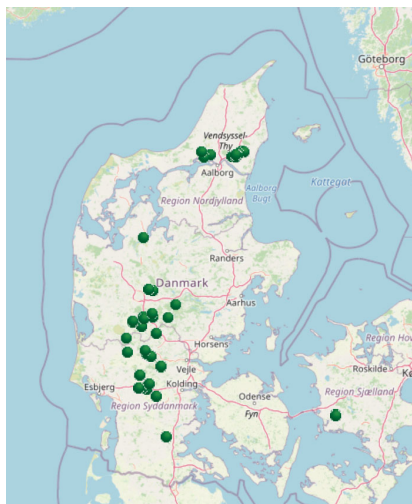
Vi indsamlede i alt 190 kartoffelblade med typiske symptomer på kartoffelbladplet (figur 2) i juli, august og september 2020 i primært Jylland (figur 3). Bladprøverne er indsamlet fra markforsøg og konventionelt dyrkede marker sprøjtet med Narita, Propulse, Revus Top eller ubehandlet. Yderlige detaljer om brugen af fungicider fra de marker, hvor der er foretaget indsamling af isolater, kan findes [her](#).

Vi isolerede *Alternaria* arter fra hvert blad og rendyrkede dem på "potato dextrose agar media (PDA)" for videre PCR-test. Vi bestemte *Alternaria*-arterne baseret på morfologisk karakteristika [8] og fandt kun *A. solani*. Dette indikerer, at kartoffelbladplet i Danmark primært skyldes *A. solani*. Derfor, blev de videre tests kun udført med PCR, som er specifik for *A. solani*.



Figur 2. Typisk kartoffelbladplet symptomer på kartoffelblad

Kartoffelafgiftsfonden



Figur 3. Indsamlingssteder primært lokaliseret i Jylland.

Identifikation af mutationer i SdhB, SdhC og SdhD i *Alternaria solani*

DNA ekstraktion og PCR analysering

DNA blev ekstraheret fra 190 rendyrkede isolater af *A. solani* på en KingFisher™ Magnetic Particle Processor (Thermo Fisher Scientific, USA) ved anvendelse af Sbeadex Mini Plant Kit (LGC- Biosearch Technologies). PCR for hver af de tre subunits i SDHI komplekset, SdhB, SdhC og SdhD blev udført ved at anvende PCR-primere, som tidligere er blevet udviklet [6]. I tabel 1 er angivet primersekvenser og optimerede PCR-betingelser, som blev anvendt i dette forsøg. DNA (n = 36) oprenset fra *A. solani* indsamlet i 2016 blev også analyseret for mutationer i Sdh B, C og D subunits. Således analyserede vi i alt 226 isolater for mutationer.

Tabel 1. PCR primere anvendt til PCR og sekventering samt PCR kørselsbetingelser for *Alternaria solani*

Sdh-gen primer navn	Primer sequence (5'→3')	Størrelse af PCR produkt (bp)	PCR program	Referen ce
SdhB				
SdhB_F	ATGGCCTCCATACGCG CTTT	1082	95°C, 2 min 35 cykler (95°C 30s, 60°C 60s, 72°C 60s) 72°C, 7 min	[6]
SdhB_R	CTAGGTGAAGGCCATG CTCTT			
SdhC				
SdhC_F1	ATGGCTTCTCAGCGGG TATTTTCAGC	570	95°C, 2 min 35 cykler (95°C 30s, 60°C 60s, 72°C 60s) 72°C, 7 min	[6]
SdhC_R1	TCCATCCAGTGCGGATA ACC			
SdhD				
SdhD_F1	ATGGCCTCCGTCATGC GT	607	94°C, 2 min 40 cykler (94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 60s) 72°C, 7 min	[6]
SdhD_R1	CCTCGGTGATACCAACA TCGTTTGTGTC			

PCR-produkter blev analyseret i 1% agarose geler inden DNA-sekventering for at kontrollere, at et

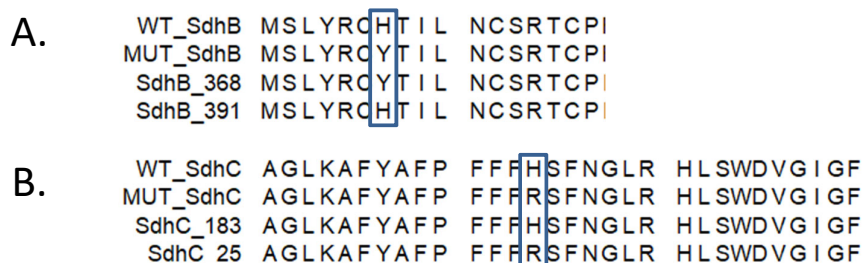
Kartoffelafgiftsfonden

PCR-produkt af den forventede størrelse blev produceret. Der blev inkluderet kontrol-DNA fra vildtype- og mutant isolater for *SdhB* og *SdhC* modtaget fra Sveriges Landbrugs Universitet (SLU) i Alnarp. PCR-produkterne blev DNA-sekventeret i begge retninger vha. de to PCR primere. Sekventering blev udført af Macrogen Europe B.V. (Amsterdam, NL). Sekvenserne blev derefter analyseret vha. CLC Main Workbench (version 8.1).

Isolater blev analyseret for mutationen, der forårsager aminosyreændringen H278Y i *SdhB*, *SdhC* blev analyseret for mutationen, der forårsager ændringen H134R og *SdhD* blev analyseret for H133R, som alle er de hyppigst forekommende mutationer i de tre sub-units i Europa (Landschoot et al. 2017). Derudover blev der testet for sjældnere forekommende mutationer, der forårsager H278R (*SdhB*), H134Q (*SdhC*) og D123E (*SdhD*) [6]og [2].

Resultater

Figur 4 viser aminosyresekvens for mutant (MUT) og vildtype (WT) og udvalgte isolater fra undersøgelsen. For *SdhB* ses ændringen H278Y og for *SdhC* ses ændringen H134R. Ingen mutationer blev påvist i *SdhD* i denne undersøgelse (tabel 2 og figur 5). Det fremgår i figur 5 og tabel 2, at H134R (*SdhC*) er den mest udbredte mutation i Danmark. Der blev ikke påvist mutationer i *SdhD* (tabel 2 og figur 5). Isolater med mutationer i *SdhB* er fundet få steder i Danmark (figur 5). De tidligere påviste mutationer som forårsager ændringerne H278R (*SdhB*), H134Q (*SdhC*) og D123E (*SdhD*) i Tyskland [9] blev ikke påvist. Få isolater havde mutation i både *SdhB* og *SdhC* i 2016 (tabel 2).



Figur 4. Aminosyresekvens for Wildtype (WT), mutant (MUT) og udvalgte isolater fra undersøgelsen. For *SdhB* ses ændringen H278Y (A) og for *SdhC* ses ændringen H134R (B). Ingen mutationer blev påvist i *SdhD* i denne undersøgelse

Tabel 2. Antal af *Alternaria solani* isolater med *Sdh* mutationer in 2016 og 2020.

Sdh subunit	Mutationer (aminosyre ændringer)	2020 (n = 190)		2016 (n = 36)	
		Antal isolater	%Isolater	Antal isolater	%Isolater
<i>SdhB</i>	H278Y	3	1,58	3	8,33
	H278R	0	0,00	0	0,00
	Udefineret	3	1,58	0	0,00
<i>SdhC</i>	H134R	150	78,95	25	69,44
	H134Q	0	0,00	0	0,00
	Udefineret	3	1,58	0	0,00
<i>SdhD</i>	H133R	0	0,00	0	0,00
	D123E	0	0,00	0	0,00
<i>SdhB</i> + <i>SdhC</i>	H278Y+H134R	0	0,00	2	5,56
Ingen mutationer		34	17,89	10	27,78

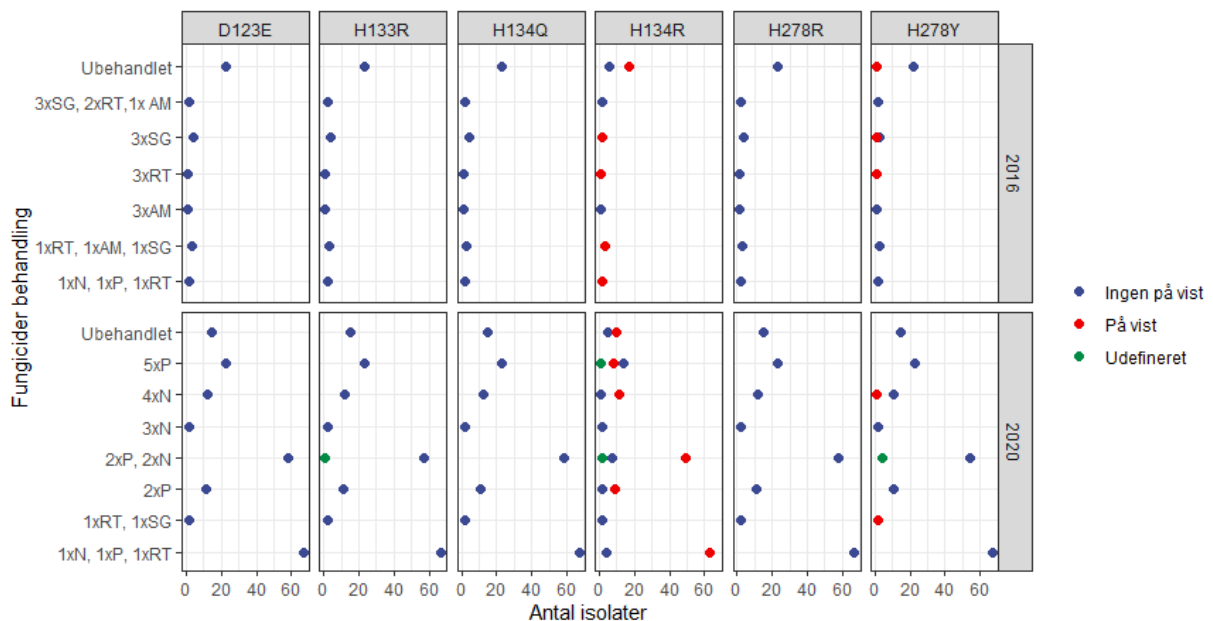
Kartoffelafgiftsfonden



Figur 5. Distribution af SDHI-mutationer i *Alternaria solani* i Danmark. Kortene fra venstre viser udbredelsen af hhv. H278R/Y for SdhB, H134R for SdhC og D123E for SdhD. Farven grøn viser WT-isolater og rød mutantisolater.

Fungicide behandling og mutationer

Figur 6 viser mutationer og fungicidbehandlingerne. De fleste isolater der blev fundet med H134R ændringen er fra kartofler, der er behandlet med 1 x Narita og 1 x Propulse og 1 x Revus Top i 2020 (figur 6). H134R og H278Y ændringerne blev ikke kun fundet på marker, der er behandlet med fungicider, men også fra ubehandlet marker/parcel. For de isolater som blev fundet i markerne, der er behandlet med fungicider, var der ingen betydelige korrelation mellem aktivstoffer og mutationer. I de marker som var behandlet med SHDI fungicider (f.eks. Signum og Propulse) blev der fundet enten H134R, H278Y eller begge ændringer (figur 6). Vi fandt også ændringerne H134R og H278Y i marker, der ikke er behandlet med SDHI-fungicider (f.eks. Narita, Revus Top, (figur 6)



Figur 6. Fungicid behandling og mutationer i 2016 og 2013. P= Propulse ([prothioconazol](#)+fluopyram), N=Narita (Difenoconazol), SG =Signum (Pyraclostrobin+ Boscalid), RT = Revus Top (Mandipropamid+difenoconazol), AM = Amistar ([azoxystrobin](#)).

Diskussioner

De fleste isolater af *A. solani* havde i 2020 H134R i SdhC, få havde H278Y i SdhB og ingen

Kartoffelafgiftsfonden

havde mutationer i SdhD. Ændringen H134Q, som for nylig er blevet påvist i SdhB i Tyskland, blev ikke påvist i de danske isolater. I tidligere studier i Tyskland og USA [6, 9] er det vist, at H134R i SdhC i *A. solani* giver mindre følsomhed overfor SDHI-fungicider for nogle isolater, men ikke for alle. Derfor ved vi endnu ikke, hvad påvisningen af denne mutation præcist betyder for bekæmpelse af kartoffelbladplet. På grund af den store variation i fænotypen af isolater med SdhC (H134R) mutation, vil vi gerne bestemme fænotypen af de danske *Alternaria*-isolater for derved at kunne undersøge sammenhængen mellem H134R og følsomhed overfor SDHI i Danmark. Mutationen er også blevet fundet i isolater indsamlet i 2016. Selvom Signum WG i Danmark blev registreret i 2010 til bekæmpelse af kartoffelbladplet, blev det først anvendt i større udstrækning fra 2013 - 2014. Det betyder, at selektionstrykket i retning af resistente isolater steg kraftigt fra og med 2013. De første indikationer på reduceret effekt i Danmark kom i 2018, hvor der år forinden var set reduceret effekt i Sverige. Vi antager, at der kan være to årsager til denne forskel. (f.eks. Sverige [3]).

1. Resistensen udvikler sig langsomt, og det tager mange år, før man oplever en betydelig reduktion i effekten af midlet.
2. Det faktum, at mutationerne er påvist, betyder ikke at midlet ikke har effekt.

H278Y i SdhB blev fundet i få isolater, og erfaringer fra andre lande (f.eks. USA, Tyskland og Belgien) viser, at denne mutation kan have stor betydning for bekæmpelse af kartoffelbladplet, da isolater med denne mutation har moderate til høj resistens overfor SDHI-fungicider [6]. Vi skal derfor være meget opmærksomme og bruge anti-resistens strategier til forebyggelse og bekæmpelse af kartoffelbladplet.

Fundet af mutationer H134R og H278Y i både ubehandlet og marker behandlet med SHDI fungicider betyder, at man skal være opmærksom og anvende alle anti-resistens strategier for at reducere udviklingen af fungicidresistens.

Konklusioner og perspektiv

- Mutationen der forårsager H134R i SdhC subunit er den mest udbredte i Danmark.
- Mutationen der forårsager H279Y i SdhB blev fundet men i lille antal isolater.
- Isolater med både H1324R og H278Y blev fundet i *A. solani* isolater i 2016.
- Følgende mutationer er ikke på vist i Danmark: H278R i SdhB subunit, H134Q i SdhC subunit, D123E og H133R i SdhD subunit.
- Mutationer blev fundet i både ubehandlede og fungicidbehandlede marker.
- H134R, H278Y eller begge blev altid påvist i de marker, der var behandlet med SHDI-fungicider
- Det er vigtigt, at anvende anti-resistens strategier for at reducere udviklingen af resistente isolater. Derudover, er der behov for forsat at overvåge forekomsten af mutationer.
- Der er også behov for viden om fænotypen af mutationerne, især for mutationen H134R i SdhC.

Offentliggørelser vedrørende projektet.

- Danmarkskort, der viser resultater kan findes på Hjemmesiden for [BlightManager](#) tilgængeligt for alle.
- Projektets foreløbige resultater er blevet præsenteret på kartoffelworkshop "2020" (titel: Kartoffelbladplet: modeller, bekæmpelse og fungicidresistens. Hvad er perspektiverne?)
- Endelige DNA-sekventeringsresultater forelå i december 2020. Derfor var det ikke muligt at medtage projektets resultater i Oversigt over Landsforsøg 2020. Men, de vil blive en del af Oversigt over Landsforsøg 2021.

Literatur

1. Lucas, J.A., N.J. Hawkins, and B.A. Fraaije, *Chapter Two - The Evolution of Fungicide Resistance*, in *Advances in Applied Microbiology*, S. Sariaslani and G.M. Gadd, Editors.

Kartoffelafgiftsfonden

- 2015, Academic Press. p. 29-92.
2. Landschoot, S., et al., *Boscalid-resistance in Alternaria alternata and Alternaria solani populations: An emerging problem in Europe*. Crop Protection, 2017. **92**: p. 49-59.
 3. Edin, E., E. Liljeroth, and B. Andersson, *Long term field sampling in Sweden reveals a shift in occurrence of cytochrome b genotype and amino acid substitution F129L in Alternaria solani, together with a high incidence of the G143A substitution in Alternaria alternata*. European Journal of Plant Pathology, 2019. **155**(2): p. 627-641.
 4. Leiminger, J.H., B. Adolf, and H. Hausladen, *Occurrence of the F129L mutation in Alternaria solani populations in Germany in response to QoI application, and its effect on sensitivity*. Plant Pathology, 2014. **63**(3): p. 640-650.
 5. Fairchild, K.L., T.D. Miles, and P.S. Wharton, *Assessing fungicide resistance in populations of Alternaria in Idaho potato fields*. Crop Protection, 2013. **49**: p. 31-39.
 6. Mallik, I., et al., *Molecular characterization and detection of mutations associated with resistance to succinate dehydrogenase-inhibiting fungicides in Alternaria solani*. Phytopathology, 2014. **104**(1): p. 40-9.
 7. Metz, N. *Biologicals for the control of Alternaria solani under greenhouse and field conditions*. in *Sixteenth EUROBLIGHT Workshop*. 2017. Aarhus, Denmark.
 8. Simmons, E.G., *Alternaria: An Identification Manual*. 2007, Utrecht, Netherlands: CBS Fungal Biodiversity Centre.
 9. Metz, N., et al., *Occurrence of sdh Mutations in German Alternaria solani Isolates and Potential Impact on Boscalid Sensitivity In Vitro, in the Greenhouse, and in the Field*. Plant Disease, 2019. **103**(12): p. 3065-3071.

Appendik 1. Screening af *Alternaria solani* og *Alternaria alternata* isolater for boscalid resistens

Indsamling strategy

1. Der indsamles to gange: August og september
2. Indsaml kun blade med typisk kartoffelbladplet læsion (se eksempler nedenstående i figur 1).
3. Indsaml maks. 6 prøver (hele blade med typiske kartoffelbladplet læsioner) fra maks. 5 forskellige marker.
4. Vi vil gerne have prøverne så friske som muligt. Derfor, skal I sende dem til os så hurtigt som muligt. Det er bedst at sætte hvert blad mellem papir før I lægger dem ind i kuverten. Prøverne sendes til Forsøgsvej, 1, 4200, Flakkebjerg, Slagelse. (ATT: Isaac Kwesi Abuley).

Kartoffelafgiftsfonden

5. Hvis det er muligt indsamles kun fra behandlede marker, især fra marker der har været sprøjtet/behandlet med boscalid/SDHI fungicider (f.eks. Signum WG).
6. Inkluder følgende informationer for hver indsamling: Sort, lokalitet og GPS koordinater.



Figure 1. Eksempel af typisk kartoffelbladplet læsion

Appendik 2. Isolation of *Alternaria* spp

Materials needed Potato dextrose agar (PDA), petri dishes, scissors or scalpel, sterile bench, sterilized filter paper, forceps,

- Only leaves showing typical early blight lesions (see Figure S1) should be used for the isolation.
- Cut small segments (lesion segment) of the leaflets with the early blight lesions. Note: ensure that there are green margins around the cut lesions for the isolation.
- Surface sterilize the lesion segment with 2% sodium hypochlorite (NaOCl) for 30 s followed by washing the leaves under running tap water for 1 min.
- Place the wet lesion segments between the sterilized filter papers to dry for about 1 minute. Note: this must be done in sterile bench.
- Placed the surface sterilized lesion segments on potato dextrose agar (PDA) media and incubate at 17 ± 2 °C under fluorescent light for 2-5 days. Note: this must be done in sterile bench.
- Note: the PDA plates should be covered but not sealed with paraffin tape to ensure rapid conidia production.
- Identification the presence of *A. solani* or *A. alternata* is done by observing their conidial morphology under the compound microscope (x20) according to Simmons (2007).
- To obtain pure culture, transfer mycelia plugs onto a new PDA plates and incubate at 17 ± 2 °C under fluorescent light for 5-7 days. Note: this must be done in sterile bench.