

Studier av infektionsprocessen av *Sclerotinia sclerotiorum* i vårraps 2008

Bakgrund

Oljeväxtodlingen har ökat kraftigt, efter den tillbakagång som följde efter EU-inträdet, och har de senaste åren uppgått till närmare 100 000 ha. En större odlad areal leder till ökad risk för angrepp av flera svårbekämpade sjukdomar. Bomullsmögel, som orsakas av *Sclerotinia sclerotiorum* (figur 1), orsakar stora skador i framförallt vårraps vissa år när nederbörden varit gynnsam för svampens utveckling. Resistens saknas och en fungicidbehandling måste göras förebyggande, innan symptomen är synliga. En förebyggande behandling kräver att odlaren gör en aktiv bedömning av risken för angrepp. Det verktyg som finns att tillgå är den "riskvärdering" som utarbetats vid SLU (Anonym, 2010), där nederbörd och lokala observationer från sklerotiedepåer ger en regional vägledning. Det finns även prognosmodeller som utvecklats utomlands tex SkleroPro (Koch *et al.*, 2007). Det har dock ofta varit svårt att få samstämmighet mellan resultatet av riskvärderingen och det slutliga angreppet. För att kunna identifiera fält med bekämpningsbehov, måste man ta hänsyn till om svampen finns i fältet och i vilken omfattning, vilket inte görs i SLU's riskvärdering eller i Skleropro.



Figur 1. Askosporer bildas i apothecier som gror från jordbundna sklerotier.

Fältsmitta kan bestämmas genom analys av kronblad, och ett agartest utvecklades i Kanada av Morall *et al.* (1991). Denna metod användes i en studie i Mellansverige (Wallenhammar och Sjöberg, 2001) där samstämmigheten mellan låg sporförekomst och låg infektionsgrad var god. Agartestet tar 5-6 dagar innan en avläsning kan göras varför metoden inte kommersialiserats. Växtpatogener kan idag snabbt identifieras med metoder baserade på DNA teknik och PCR-amplifiering av nukleinsyrasekvenser (Ward *et al.*, 2004).

En vidareutveckling av PCR-tekniken är sk real-time quantitative PCR, som ger möjlighet att kvantifiera specifikt DNA i ett prov (Schena *et al.*, 2004). En metod baserad på realtids-PCR, som snabbt och effektivt detekterar infekterade kronblad i fält utvecklades under 2006-2007 i SLF projektVO655009 (Wallenhammar *et al.*, 2008). Under 2007 visade analyserna stor förekomst av infekterade kronblad i flera fält, medan fältangreppen blev låga i några av dessa fält, trots att förhållandena för svampens utveckling bedömdes som gynnsamma.

Syftet med detta projekt är att öka kunskaperna om infektionsprocessens förlopp genom att detektera förekomsten av svampens DNA under hela blomningsperioden på rapsplantans olika delar; på kronblad och på blad på olika nivåer av stjälken. Vi vill föra in nya parametrar som ökar precisionen i en förbättrad riskvärdering med ambitionen att bedöma vilka fält som behöver behandlas.

Material och metoder

Studier av infektionsförloppet i fält

Val av sorttyper

Två olika sorttyper undersöktes i två fältförsök under 2008. SW Joplin (sort A) representerar den vanligast förekommande sorttypen - högväxande med snabb uppkomst. Ssd Nex 180 (sort B) är mer lågvuxen och långsamväxande under uppkomst- och etableringsfasen. Sorttyp A ger vanligen ett kraftigt bestånd, medan sorttyp B ger ett glesare bestånd. Ssd Nex 180, har varit populär bland lantbrukarna då de erbjudits ett attraktivt pris.

Fältförsök

Försöksdesignen är en randomiserad block design med 2 led x 4 block. Rutstorleken är 45 m². Två fältförsök anlades med olika sorttyper (enligt ovan) i Örebro län (tabell 1). Försöksplatserna lokaliserades till fält med dokumenterad förekomst av bomullsmögel senast oljeväxter odlades på försöksfälten och intilliggande fält (tabell 1). I projektupplägget ingick inte skörd av försöken.

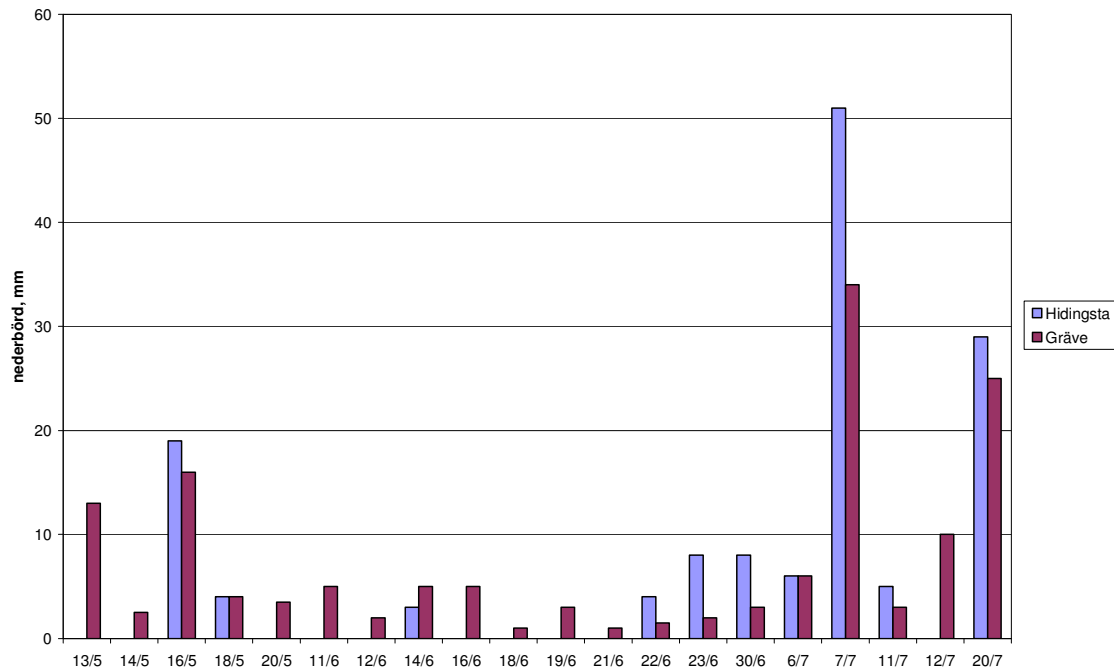
Tabell 1. Beskrivning av försöksplatserna 2008.

Försöksplats	Såtidpunkt	Jordart	Senaste oljeväxtgröda år
Hidingsta, Kumla	29 april	mh lmo	1998
Gräve, Örebro	5 maj	mh lmo	2000

I samband med sådden blandades 2,25 g sklerotier tillsammans med utsädet, vilket motsvarar 120-150 st sklerotier eller 3-4 sklerotier per m². Sklerotierna samlades in ifrån infekterade rapsstjälkar 2007, och förvarades under vinterhalvåret nergrävda i jord på 5 cm djup i en nylonförpackning. Dessutom grävdes fyra depåer med sklerotier från Växtskyddscentralen ned i kanterna av försöket. Regnmängder från båda försöksplatserna dokumenterades (tabell 2 och figur 2).

Tabell 2. Antal regndagar, total nederbörd och medeltemperatur före och under blomningsperioden på försöksplatserna Hidingsta och Gräve 2008.

	Antal regndagar	Nederbörd mm	Medeltemperatur dygn, C°
Hidingsta			
Två veckor före blomning	3	15	14,5
Under blomning	5	99	16,3
Gräve			
Två veckor före blomning	9	25	14,5
Under blomning	6	81	16,3



Figur 2. Nederbördsmängder vid försöksplatserna år 2008 från sådd till avslutad blomning.

Insamling av växtprover

Försöken besöktes under blomningsperioden var femte dag för provtagning. Provtagningar gjordes första gången den 24 juni och avslutades den 18 juli. Totalt togs prover vid sex tidpunkter. Vid varje provtagningstillfälle klipptes tre plantor i varje parcell för detektion av sporer på blad. Plantorna placerades i plasticsäckar och transporterades till laboratoriet. För att kategoriseras som ett blad, bestämdes att bladets längd inte fick understiga 5 centimeter. Bladen plockades av och placerades individuellt i plastpåsar märkta med bladnivånummer. Dessutom klipptes slumpmässigt tio blomställningar per parcell i fält som placerades i enskilda plastpåsar. På laboratoriet placerades sedan ett kronblad från varje blomställning individuellt i 0,2 ml rör för senare PCR-analys, totalt tio prover per parcell. Samliga växtprover förvarades i frys och transporterades i kylväska till det molekylärbiologiska laboratoriet på Eurofins Food and Agro AB i Lidköping. Vid varje provtagningstillfälle gjordes en räkning av antalet uppkomna apothecier i sklerotiedepåerna.

Bestämning av sjukdomsangrepp

Gradering av fältförsöken gjordes i mitten av augusti när oljeväxterna var i begynnande mognad. Då undersöktes 50 plantor på fyra platser i parcellen en meter in i parcellen från kortsidan och rad nummer 6 från höger och vänster sida. Totalt undersöktes 200 plantor per parcell. Plantorna bestämdes som friska eller infekterade och redovisas som procent infekterade plantor.

Statistisk bearbetning

Resultaten bearbetades statistiskt med SAS Enterprise Guide.

DNA-analys

För analys och kvantifiering av *S. sclerotiorum* DNA har analysmetoden som utvecklades i SLF-projektet VO655009 använts (Wallenhammar *et al.*, 2008). DNA extraheras från separata kronblad och blad och därefter detekteras *S. sclerotiorum* på dessa med Realtids-PCR.

Analysen av blad fungerar på ett liknande sätt som för kronblad, men här har en annan typ av DNA-extraktion som är anpassad för en större provvolym använts (E.Z.N.A. SP Plant DNA Miniprep Kit, Omega Bio-Tek, USA). Första delen i protokollet har modifierats. Blad klippt i små bitar inkuberades tillsammans med 10 ml CTAB-buffert samt 30 µl Proteinase K under 2 timmar i 60° C. Efter centrifugering (5 min 1750xg) tillsattes 5 µl RNase till 1 ml supernatant som sedan inkuberades ytterligare 15 min i 60° C. Efter centrifugering (1 min >10 000xg) blandades 600 µl supernatant med 210 µl SP2. Därefter följdes tillverkarens protokoll. Bladextrakten späddes 2x innan analys.

Analys med realtids-PCR

PCR-analys har körts på en stor del av det insamlade materialet. Prioriteringar har gjorts för att fånga in avgörande händelser inom budgetramen. Undersökningarna inleddes med analys av kronbladen, därefter valdes provtagningstillfällena 4, 9 och 14 juli för bladanalys. Proverna från Hidingsta analyserades i första hand då smittotrycket bedömdes som högst på denna försöksplats. Bladproverna från tidpunkt 1 och 2, samt proverna från Gräve har inte kunnat analyseras inom ramen för projektets budget.

Totalt har 720 kronblad och 140 blad analyserats. Från varje parcell analyserades 10 kronblad från tio olika blomställningar vid respektive provtagningstillfälle.

Resultat

Resultaten av PCR-analyserna av kronbladen sammanfattas i tabell 3 och 4 och visar att sporer förekommer redan vid första provtagningstillfället. En kraftig förhöjning i antalet infekterade kronblad sker efter 50 mm nederbörd den 7 juli (fig 2). Statistisk bearbetning visar signifikanta skillnader i procent infekterade kronblad de två sista provtagningstidpunkterna jämfört med de tre första tidpunkterna i sort B på Hidingsta (tabell 3). För sort A förekom inga signifikanta skillnader beroende på stora variationer mellan blocken. Ett medeltal för båda sorterna visar statistisk skillnad mellan tidpunkterna (tabell 3).

Tabell 3. Procent infekterade kronblad Hidingsta enligt PCR-analys 2008. Kronblad från två olika sorter (A= SW Joplin och B= Ssd Nex 180) analyserades i fyra block (I-IV) samt medelvärde av båda sorterna.

Datum	Sort A					Sort B					Sort A och B	
	I	II	III	IV	Medel-värde	I	II	III	IV	Medel-värde	Medelvärde	
24 juni	20	40	10	0	18 a	20	0	10	10	10 b ²	14 bc	
30 juni	10	0	10	0	5 a	0	0	10	0	3 b	4 c	
4 juli	10	30	30	10	20 a	10	10	10	0	8 b	14 bc	
9 juli	10	10	10	20	13 a	40	10	40	30	30 a	21 ab	
14 juli	0	30	40	70	35 a	20	20	30	20	23 a	28 a	

¹: Vid varje provtagningstillfälle har 10 kronblad från respektive block analyserats.

² Olika bokstäver indikerar statistiskt signifikanta skillnader (p<0,05) mellan provtagningstidpunkterna enligt Duncan's multiple range test²

På försöksplatsen i Gräve var andelen infekterade kronblad statistiskt högre, i medeltal 29 %, för båda sorterna den 14 juli jämfört med de andra tidpunkterna (tabell 4). Inga sortskillnader hittades i Gräve. Medeltal för samtliga kronbladsanalyser presenteras i tabell 5. En jämförelse mellan försöksplatserna visar att infektionsnivån var lägre i Gräve jämfört med Hidingsta (p<0,05). Infektionsnivån ökade snabbare i Hidingsta, men den 14 juli fanns det inga skillnader i infektionsnivå mellan platserna (tabell 5).

Tabell 4. Procent infekterade kronblad Gräve enligt PCR-analys. Kronblad från två olika sorter (A= SW Joplin och B= Ssd Nex 180) analyserades i fyra block (I-IV).

Andel infekterade kronblad (%) ¹											
Sort A						Sort B				Sort A och B	
Datum	I	II	III	IV	Medel	I	II	III	IV	Medel	Medelvärde
30 juni	0	10	0	0	3 b ²	0	0	10	0	3b	3 b
4 juli	0	0	0	10	3 b	0	11	0	0	3b	3 b
9 juli	0	0	0	10	3 b	0	0	0	0	0b	1 b
14 juli	20	20	30	30	25 a	60	20	40	10	33a	29 a

¹: Vid varje provtagningstillfälle har 10 kronblad från respektive block analyserats.

² Olika bokstäver indikerar statistiskt signifikanta skillnader (p<0,05) mellan provtagningstidpunkterna enligt Duncan's multiple range test.

Tabell 5. Procent infekterade kronblad enligt PCR-analys. Medeltal för sort A (SW Joplin) och sort B (Ssd Nex 180)

Andel infekterade kronblad (%) medeltal för sort A och B		
Datum	Hidingsta	Gräve
24 juni	13,8	
30 juni	3,8 a ¹	2,5 a
4 juli	13,8 a	2,6 b
9 juli	21,3 a	1,3 b
14 juli	28,8 a	28,8 a

¹ Olika bokstäver indikerar statistiskt signifikanta skillnader (p<0,05) enligt Duncan's multiple range test.

I tabell 6-7 presenteras resultaten av realtids PCR-analyserna av blad för provtagningstidpunkt 4 juli på Hidingsta. Ct-värdet är ett mått på mängden DNA i provet. Ett högt Ct-värde innebär en liten mängd specifikt DNA och ett lågt Ct-värde innebär en stor mängd specifikt DNA. En skillnad i Ct-värde på 1 motsvarar två gångers skillnad i mängd DNA och 3,32 motsvarar tio gångers skillnad i mängd DNA. Strikt kan Ct-värden egentligen endast jämföras mellan prover analyserade vid ett och samma tillfälle, såvida en standard inte har analyserats samtidigt. Stora skillnader går dock att jämföra ändå.

Tabell 6. PCR-analys av blad på Hidingsta 4 juli 2008. Tre olika blad på bladnivå 1 (uppför från räknat) analyserades blockvis (I-IV). Blad från två olika sorter undersöktes (A= SW Joplin och B= Ssd Nex 180). Ca 10 % lägre vikt på blad från sort B jämfört med sort A Gråmarkerade prover är ej analyserade.

Analysresultat bladnivå 1 den 4 juli 2008 (Ct-värden) ¹								
Sort A (4 av 12 positiva)					Sort B (4 av 12 positiva)			
Blad nr	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1	negativ	negativ		34,22 ²	negativ	34,08 ²		33,98 ²
2	37,33	negativ	negativ	37,51 ²	34,24 ²	negativ	negativ	negativ
3	34,71	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	33,41 ²

¹: Resultatet visas som Ct-värden (medelvärde för två replikat). ²: Endast ett replikat positivt.

Tabell 7. PCR-analys av blad på Hidingsta 4 juli 2008. Tre olika blad på bladnivå 3 (uppför från räknat) analyserades blockvis I-IV). Blad från två olika sorter undersöktes (A= SW Joplin och B= Ssd Nex 180). Ca 40% större vikt på blad från sort B jämfört med sort A.

Analysresultat bladnivå 3 den 4 juli 2008 (Ct-värden) ¹								
Sort A (7 av 12 positiva)					Sort B (6 av 12 positiva)			
Blad nr	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1	38,08 ²	negativ	negativ	33,95	34,35	32,29	negativ	negativ
2	33,99	35,39 ²	33,90 ²	negativ	32,99 ²	33,02 ²	negativ	negativ
3	36,18	35,23 ²	negativ	negativ	negativ	32,61 ²	negativ	32,79 ²

¹: Resultatet visas som Ct-värden (medelvärde för två replikat). ²: Endast ett replikat positivt.

I tabell 8-10 presenteras resultaten från provtagningen den 9 juli. Resultaten visar variation i mängd och enstaka blad innehåller stor mängd företrädesvis på de lägre bladnivåerna tabell 9 - 10). DNA detekterades på samtliga undersökta blad på nivå 5, på 88 % av bladen på bladnivå 3 och på 33 % av bladen på bladnivå 1. I block 4 detekteras inte DNA på bladnivå 1 (tabell 8).

Tabell 8. PCR-analys av blad på Hidingsta 9 juli 2008. Tre olika blad på bladnivå 1 (uppifrån räknat) analyserades blockvis (I-IV). Blad från två olika sorter undersöktes (A= SW Joplin och B= Ssd Nex 180) . Ca 10 % högre vikt på blad från sort B jämfört med sort A.

Analysresultat bladnivå 1 den 9 juli 2008 (Ct-värden) ¹								
Sort A (4 av 12 positiva)					Sort B (5 av 12 positiva)			
Blad nr	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1	negativ	35,34	negativ	negativ	35,26 ²	negativ	negativ	negativ
2	negativ	negativ	35,40	negativ	34,19	34,23 ²	negativ	negativ
3	37,03	35,24 ²	negativ	negativ	34,59	35,21	negativ	negativ

¹: Resultatet visas som Ct-värden (medelvärde för två replikat). ²: Endast ett replikat positivt

Tabell 9. PCR-analys av blad på Hidingsta 9 juli 2008. Tre olika blad på bladnivå 3 (uppifrån räknat) analyserades blockvis. Blad från två olika sorter undersöktes (A= SW Joplin och B= Ssd Nex 180) . Ca 90 % högre vikt på blad från sort B jämfört med sort A.

Analysresultat bladnivå 3 den 9 juli 2008 (Ct-värden) ¹								
Sort A (9 av 12 positiva)					Sort B (12 av 12 positiva)			
Blad nr	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1	34,03	35,76	37,54 ²	negativ	31,48	31,48	34,35	35,25
2	negativ	36,44	33,94	38,59 ²	32,06	31,62	34,45	37,05
3	35,16	39,05 ²	negativ	34,31 ²	37,56	32,26	28,91	36,64

¹: Resultatet visas som Ct-värden (medelvärde för två replikat). ²: Endast ett replikat positivt.

Tabell 10. PCR-analys av blad på Hidingsta 9 juli 2008. Tre olika blad på bladnivå 5 (uppifrån räknat) analyserades blockvis (I-IV). Blad från två olika sorter undersöktes (A= SW Joplin och B= Ssd Nex 180). Ca 60 % högre vikt på blad från sort B jämfört med sort A. Gråmarkerade rutor innebär att blad saknas på denna nivå.

Analysresultat bladnivå 5 den juli 2008 (Ct-värden) ¹								
Sort A (10 av 10 positiva)					Sort B (10 av 10 positiva)			
Blad nr	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1	26,45	36,27	35,73	36,88	35,95	30,18	35,73	36,07 ²
2	37,76	32,47		37,46	32,51	26,30	34,09	36,08 ²
3		36,80	35,87 ²	35,16	34,12	32,80		

¹: Resultatet visas som Ct-värden (medelvärde för två replikat). ²: Endast ett replikat positivt.

En sammanställning av alla analyser visas i tabell 11. Mellan 50 och 58 % av bladen på bladnivå 3 visade förekomst av DNA den 4 juli. Den 9 juli påvisades DNA på 75 % av bladen i sort A och på samtliga blad i sort B. Bladnivå 1 uppvisade lägre andel infekterade blad, 36 % i båda sorterna den 4 juli, och 33 % den 9 juli.

Tabell 11. PCR-analys av blad på Hidingsta. Blad från två olika sorter undersöktes (A= SW Joplin och B= Ssd Nex 180). Sammanställning av samtliga blad.

Procent (%) infekterade blad, 4 block med 2-3 upprepningar				
Sort A		Sort B		
Bladnivå	4 juli	9 juli	4 juli	9 juli
1	36 (18)	33 (25)	36 (0)	33 (17)
3	58 (25)	75 (50)	50 (17)	100
5	Ej analyserad	100 (90)	Ej analyserad	100 (80)

Inom parentes visas resultatet då prov endast anses som positivt då 2 av 2 replikat är positiva.

I tabell 12 presenteras en sammanställning av analysresultaten från bladanalyser från samtliga bladnivåer som endast undersökts i block 1 vid tre tidpunkter. Det framgår att frekvensen positiva analyser är större i sort B jämfört med sort A. Det framgår också att smittan är väl etablerad på lågt sittande blad i sort A den 4 juli, och att sporer sprids uppåt i beståndet. I sort B är smittan redan väl etablerad på samtliga bladnivåer den 4 juli.

Tabell 12. PCR-analys av blad på Hidingsta. Blad från två olika sorter undersöktes (A= SW Joplin och B= Ssd Nex). Resultatet visas för blad på olika bladnivåer. Gråmarkerade rutor innebär att blad saknas på denna nivå.

Bladnivå	Analysresultat					
	Sort A Block I			Sort B Block I		
	4 juli	9 juli	14 juli	4 juli	9 juli	14 juli
1	--	--	+-	+-	--	+-
2	--	+-	++	+-	++	++
3	--	--	++	++	++	++
4	++	--	++	++	++	++
5	++	++	++	++	++	--
6	++	+-		+-	++	
7	++					
8	++					

Fältförsök

Angreppsnivåerna i fält var högre i den tätväxande sorttypen A och resultaten är statistiskt signifikanta (tabell 13-14). Variation i angrepp mellan blocken förekommer men är inte statistiskt säkerställd (tabell 13), men indikerar skillnader i förekomst av markburen smitta (sklerotier).

Tabell 13. Angreppsnivå av bomullsmögel i fältförsök på Hidingsta och i Gräve 2008 uttryckt som procent angripna plantor i medeltal för varje block.

Block	Sort A (SW Joplin)	Sort B (Ssd Nex 180)
<i>Hidingsta</i>		
I	10,0 a ¹	6,5 a
II	7,0 a	5,0 a
III	7,0 a	3,0 a
IV	4,5 a	2,0 a
<i>Gräve</i>		
I	5,0 a	0,0 a
II	6,5 a	1,5 a
III	1,0 a	1,5 a
IV	7,0 a	0,5 a

¹Olika bokstäver indikerar statistiskt signifikanta skillnader (p<0,05) enligt Duncan's multiple range test.

Tabell 14. Medeltal av sortvis angreppsnivå av bomullsmögel i fältförsök på Hidingsta och i Gräve 2008 uttryckt som procent angripna plantor.

Försöksled	Procent angripna plantor
A. SW Joplin	3,0 a ¹
B. Ssd Nex	1,25 b

¹Olika bokstäver indikerar statistiskt signifikanta skillnader (p<0,05) enligt Duncan's multipla range test.

Angreppsnivån var statistiskt signifikant högre på försöksplatsen i Hidingsta jämfört med Gräve (tabell 15).

Tabell 15. Angreppsnivå av bomullsmögel i fältförsök uttryckt som procent angripna plantor i medeltal för respektive försöksplats

Försöksplats	Procent angripna plantor
Hidingsta	2,81 a ¹
Gräve	1,44 b

¹Olika bokstäver indikerar statistiskt signifikanta skillnader ($p < 0,05$) enligt Duncan's multiple range test.

Diskussion

Resultaten visar att DNA av *S. sclerotiorum* fanns på kronbladen redan vid första provtagningstillfället i begynnande blomning, vilket överrensstämmer med resultat från tidigare undersökningar då provtagningen utfördes vid samma utvecklingsstadium (Wallenhammar *et al.*, 2007, Wallenhammar *et al.*, 2008). Nivåerna vid första provtagningstillfället visade förekomst av DNA på i medeltal 13,7% av kronbladen i Hidingsta och i medeltal 2,5 % av kronbladen i Gräve, och indikerar enligt tidigare undersökningar att endast låga angrepp kommer att utvecklas. Detta överrensstämmer med resultaten av fältgraderingarna som visade låga angrepp, i medeltal 2,8 % på Hidingsta och 1,4 % i Gräve.

Trots att sporförekomsten ökade snabbare i Hidingsta jämfört med Gräve, var nivån likartad den 14 juli, vilket tyder på att sporförekomsten inte följer något utvecklingsmönster utan kan plötsligt öka då förhållanden blir gynnsamma. Den snabbare ökningen av sporförekomst på Hidingsta påverkade heller inte angreppen i fält. Visserligen var angreppen signifikant högre på Hidingsta, dock var nivåerna på båda platserna relativt lika och låga (tabell 4).

Förekomsten av DNA varierade mellan blocken både på kronblad och på blad (tabell 3 och 6-8). Detta visar att en sjukdom med jordbunden smitta förekommer fläckvis, liknande *Rhizoctonia solani* i potatis (Gilligan *et al.*, 1996) och klumprotsjuka i olje- och kålväxter som orsakas av *Plasmodiophora brassicae* (Wallenhammar, 1998). Samtidigt verkar inte de sklerotier som såddes ut med utsädet ha bidragit till sporspridningen.

Resultaten från fältgraderingar visade att Ssd Nex 180 hade lägre angreppgrad, 1,25 % jämfört med SW Joplin, 3,0 % (tabell 4). Detta visar att beståndsutvecklingen i Ssd Nex 180 påverkar mikroklimatet i beståndet och hämmar sjukdomsutvecklingen eftersom inga skillnader mellan sorterna hittades i sporförekomst (tabell 3-4, 6-10 och 12). Temperatur, luftfuktighet och beståndsstruktur är två faktorer som har känd påverkan på sjukdomsutvecklingen (Blad *et al.*, 1978; Harikrisnan och Rio, 2006). Den låga sporförekomsten har medfört låga angreppsnivåer i på försöksplatserna, vilket bekräftar resultaten som uppnått i tidigare undersökningar (Wallenhammar *et al.*, 2007, Wallenhammar *et al.*, 2008).

För bladdetektionen valdes en senare tidpunkt, 4 juli som start och av tabell 10 framgår att DNA av *S. sclerotiorum* var etablerat på bladnivå 4-8 i SW Joplin och på samtliga undersökta nivåer i Ssd Nex 180 i block 1. Vid sista provtagningstillfället den 14 juli detekterades DNA på samtliga bladnivåer på försöksplatsen i Hidingsta.

Nederbörds mängderna vid tiden före blomning och under blomningen var små (tabell 1). I länsinventeringen av 20 fält var i medeltal 4,5 % av plantorna infekterade (Redner,

muntligen). Graderingarna som gjordes i omgivande försöksfält visade angreppsnivåer på 14 respektive 17 % (tabell 1) vilket visar att vi valt försöksplatser som är lämpliga för denna typ av undersökning. En orsak till att nivåerna i försöken var lägre är sannolikt att dessa såddes någon eller några dagar senare än fältet. Det var särskilt påtagligt på försöksplatsen i Gräve där beståndet i försöket låg efter i utvecklingen jämfört med fältet i övrigt. Ssd Nex 180 visade också en sen etablering, vilket medförde en sen slutning av beståndet. En riskbedömning med befintlig värdering (anonym, 2010) visar 60 % risk för att angreppet ska bli > 20 procent. Den mest avgörande faktorn för infektion är angreppsnivån senast oljeväxter odlades på fältet, vilket också stämmer med erfarenheter av Twengström (1998) och Koch *et al.*, (2007). Detta visar att om inokulum finns i fältet, räcker den markfukt som finns i kombination med ett kraftigt bestånd på en mojord för att apothecier skall bildas. För optimal infektion skall kronbladen vara omväxlande fuktiga och torra (Brun, 1983), vilket tyder på att nattedagen och någon regnskur utgör gynnsamma infektionsförhållanden. Att förlita sig på nergrävda sklerotiedepåer är också missvisande då endast en apothecie påträffades i en av depåerna i Hidingsta den 18 juli.

En hållbar produktion kan uppnås först när vi kostnadseffektivt kan detektera och förutsäga risken för angrepp i varje enskilt oljeväxtfält, där bekämpning med de preparat som finns att tillgå måste utföras förebyggande. Våra resultat visar att förekomst av smitta går att bestämma genom att detektera DNA på blad, vilket till vår kännedom inte har visats tidigare. Vi har visat att inokulum som orsakar infektion finns på såväl kronblad som blad, och att förekomsten inledningsvis är högre på lågt sittande blad jämfört med de översta bladen på de undersökta rapsplantorna. Vid graderingarna har också angreppen konstaterats på den nedre hälften av stjälken, ofta nära markytan, vilket tyder på att infektionen utvecklas via lågt sittande blad. Blad av sorten Ssd Nex 180 visade högre vikt, men sortens växtsätt har haft avgörande betydelse för sjukdomsutvecklingen. Dessa undersökningar har fortsatt i SLF-projekt H086030 under 2009 och i H0960195 under 2010. Projektet kommer att avslutas under 2011, då verktyg för ökad precision i riskbedömningen kommer att presenteras.

Publikationer

Referee-granskad tidskrift full paper

Wallenhammar, A-C, Almquist, C, Redner, A. and Sjöberg, A. 2008. Improved risk assessment of Sclerotinia stem rot in oilseed rape using real-time PCR. Conference on Applied Aspects of Aerobiology at Rothamsted Research, Harpenden, Herts, UK 19 November 2008. Aspects of Applied Biology 89.

Referee-granskad konferens abstract

Wallenhammar, A-C., Almquist, C., Redner, A., and Sjöberg, A. 2008. Improved risk assessment of Sclerotinia Stem Rot in Oil seed rape by quantitative PCR- assay. 9th International Congress on Plant Pathology, Torino, 23-31 August, Italy.

Konferens (svensk)- full paper

Wallenhammar, A-C., Almquist, C., Redner, A. And Sjöberg, A. 2008. Bomullsmögel i oljeväxter- förbättrad riskbedömning med realtids- PCR. Rapport från Växtodlings- och växtskydds dagar i Växjö den 10 och 11 december 2008. Meddelande från Södra Jordbruksförsöksdistriktet, 61.

Övrig resultatförmedling till näringen 2008

Sveakonferensen, Brunnby 15 januari. Muntlig presentation; ca 70 deltagare
Information till växtskyddscentralerna och rådgivare juni; skriftlig information om
projektresultat med e-post
ÖSF- konferensen, Linköping 3 december. Muntlig presentation; ca 50 deltagare
Växjö möte 11 december. Muntlig presentation; ca 120 deltagare

Referenser

- Anonym. 2010. Riskvärdering för bomullsmögel i våroljeväxter. Hämtat från
<http://www.ffe.slu.se/sve> 3 november 2010.
- Blad, B.L., Steadman, J.R. and Weiss, A. 1978. Canopy structure and irrigation influence white mold disease and microclimate of dry edible beans. *Phytopathology* 68, 1431-1437.
- Brun, H, Pierre, J.G., Renard M. 1983. Techniques d'inoculation du colza par *Sclerotinia sclerotiorum*. 6th International Rapeseed Congress, Paris 17-19 May, 1983, 1041-1044.
- Gilligan, Ca, Simons, SA, Heide, G.A. 1996. Inoculum density and spatial patterns of *Rhizoctonia solani* in field plots of *Solanum tuberosum*: Effects of cropping frequency, *Plant Pathology* 45, 232-244.
- Harikrishnan, R. & del Río, L.E. 2006. Influence of temperature, relative humidity, ascospore concentration, and length of drying of colonized dry bean flowers on white mold development. *Plant Disease* 90, 946-950.
- Koch, S., Dunker, S., Kleinhenz, B., Röhrig, M. & von Tiedemann, A. 2007. A crop loss-related forecasting model for sclerotinia stem rot in winter oilseed rape. *Phytopathology* 97, 1186-1194.
- Morall, R.A.A, Turkington, TK., Kaminski, D.A., Thomson, J.R., Gugel, R.K. and Rude, S.V (1991). Forecasting *Sclerotinia* stem rot of spring rapeseed by petal testing. *Proceedings 8th International rapeseed Congress*, Saskatoon, Canada, 483-488.
- Schena, L., Nigra, F., Ippolito, A och Gallitelli, D. Real- time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology*. 110: 893-908.
- Twengström, E. (1999) Epidemiology and forecasting of *Sclerotinia* stem rot on spring sown oilseed rape in Sweden. *Doctoral Thesis, Agraria* 181, 11-12.
- Wallenhammar, A-C., 1998. Observations on yield loss from *Plasmodiophora brassicae* infections in spring oilseed rape. *Zeitschrift f Pflanzenkrankheit und Pflanzenschutz* 105,1-7.
- Wallenhammar, A-C, Almqvist, C, Redner, A. and Sjöberg, A. 2008. Improved risk assessment of *Sclerotinia* stem rot in oilseed rape using real- time PCR. *Conference on Applied Aspects of Aerobiology at Rothamsted Research, Harpenden, Herts, UK* 19.
- Wallenhammar. A-C, Redner, A och Sjöberg, A. 2007. Development of methods improving precision of risk assessment of *Sclerotinia* Stem Rot in Oilseed rape. *12th International Rapeseed Congress*, Wuhan, Hubei, China, March 26-30, 2007.
- November 2008. *Aspects of Applied Biology* 89.
- Wallenhammar, A-C., and Sjöberg, A. 2001. Agartest-ett enkelt hjälpmedel vid riskbedömning av bomullsmögel i oljeväxter. *Svensk Frötidning*, 3
- Ward, E., Foster, S. J., Fraaije, B. A., och McCartney, H.A. 2004. Plant Pathogen diagnostics and nucleic acid related approaches. *Annals of Applied Biology* 145, 1-16.