

# Slutrapport för SLF projekt H1160210

## Snabb och säker diagnos av patogener på rödklöver i jord och rot samt värmebehandling av rödklöverfrö för ökad utsädeskvalitet

Ann-Charlotte Wallenhammar<sup>1</sup>, Charlotta Almquist<sup>2</sup>, Eva Stoltz<sup>1</sup> och Zahra Omer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>HS Konsult AB, Lantmännen Reppe

### 1. Bakgrund

Rödklöver (*Trifolium pratense* L.) är en av de viktigaste proteingrödorna i svensk mjölkproduktion och utgör motorn i ekologiska växtodlingssystem då kväveförsörjningen baseras på den symbiotiska kvävefixeringen hos baljväxter som ingår i växtföljden. Den svaga uthålligheten hos rödklöver har under lång tid begränsat produktionen och minskningen i klöverhalt över tid i rödklöver-gräsvallar är påtaglig (Frankow-Lindberg, 1989; Nykänen *et al.*, 2000, Wallenhammar *et al.*, 2008). Rödklöverplantorna försvagas snabbt genom angrepp av rottröta, där jordbundna patogena svampar bl.a. ur släktet *Fusarium*, *Cylindrocarpon destructans*, *Phoma medigaginis* var *pinodella* ingår (Rufelt, 1986, Almquist *et al.* 2016b). Rotrötans stora utbredning i landets vallar visades av Rufelt (1986), och omfattande angrepp påträffades senare i ekologiska vallar i Syd- och Mellansverige (Wallenhammar *et al.*, 2005). Etableringen kan också vara nyckfull vilket medför ojämna bestånd, och här kan både jordbundna svampar och utsädes utsädesburna svampar påverka (Lager och Johnson, 2002). Vallfröutsädet kan inte uteslutas vara en källa till infektion, och då sundhetsanalyser inte är krav för certifiering är kunskapen begränsad. *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. och *Phoma* spp. från två veckor gamla groddplantor isolerades av Lager och Johnsson (2002), och efter värmebehandling med Thermo Seed ökade fältuppkomsten med 38 %. Resistensförädling av sorter med egenskaper som motståndskraft mot dessa jordbundna patogener är huvudspåret för att förbättra uthålligheten men hittills har inga större skillnader i motståndskraft mot rottröta mellan olika sorter eller olika skördesystem kunnat på visas (Wallenhammar, 2010, Wallenhammar *et al.*, 2014). Syftet är att förbättra odlingssäkerheten och behålla en långsiktigt hög produktionsnivå i rödklövervallar. Nya molekylära analysverktyg används för kvantitativ specifik bestämning av de patogener som orsakar rottröta i rödklöver. Utsädesburna patogener saneras genom värmebehandling med Thermo Seed för att säkerställa etablering. Följande hypoteser ställdes; i) Med utvecklad real-tids PCR teknik det epidemiologiska förloppet hos olika patogener beskrivas genom analys av rötter över tid ii) mottaglighet hos olika sorter kan effektivt utvärderas med real-tids PCR iii) kvaliteten hos rödklöverfrö kan förbättras genom värmebehandling iv) patogenförekomsten i olika delar av landet kan beskrivas med utvecklad real-tids PCR- analys v) putsning av klövervallen ökar angreppet av rottröta.

### 2. Metodik

#### 2.1 Studier av infektionsförloppet i obehandlat och värmebehandlat utsäde

Fyra utvalda fröpartier med låg grobarhet >80 % SW Nancy (1294), SW Nancy (1288), SW Nancy (1287) och SW Ares (1090) användes 2013. Fem partier användes 2014; SW Ares 1570, SW Ares 1638, SW Vicky 1574, SW Vicky 1575 och SW Nancy 1633. Detta år var det svårare att hitta utsäde med låg grobarhet (tabell 1). Utsädet värmebehandlades med Thermo Seed™ av Incotec AB, Uppsala och jämfördes med obehandlade frön från samma partier. Samtliga fröpartier har valts och erhållits av Tore Dahlquist, SFO, vid denna tid verksam vid Lantmännen Lantbruk.

##### 2.1.1 Isolering av patogena svampar från utsädespartier av rödklöver

Svamparna isolerades i PDA (Potato dextrose agar, Difco) plus antibiotika, Chloramphenicol enligt Lager & Johnsson (2002). 100 behandlade och 100 obehandlade frön användes för isolering av svampar., Samtliga svampkulturer initierats från "single" sporer innan

morfologisk identifiering med ljusmikroskop. Grobarhetstesterna är gjorda av Incotec AB och 2014 gjordes kompletterande grobarhetsanalyser vid Frökontrollen Mellansverige.

### 2. 1. 2 Fältförsök

Den 5 juni 2013 anlades ett nytt försök på Kvinnersta norr om Örebro med fyra olika fröpartier med och utan Thermo Seed (TS) behandling enligt följande plan: Försöksrutorna var 10,5 m<sup>2</sup> och arrangerade i ett randomiserat blockförsök med fyra upprepningar. Plantor räknades i 2 x 1 fastlagda radmeter per ruta vid två tidpunkter; 26 juli och 22 augusti. Den 11 juli 2014 anlades ytterligare ett försök på Åkerby väster om Örebro. Försöksrutorna var 9 m<sup>2</sup>. Planträkning gjordes som ovan den 4 augusti och 17 september.

## 2.2 Uppsättning och utvärdering av analysmetoder med PCR-teknik

### 2.2.1 DNA extraktion från rötter

Molekylärbiologiska analysmetoder för detektion och kvantifiering av *Fusarium culmorum*, *F. avenaceum*, *Cylindrocarpon destructans* och *Phoma* spp med realtids-PCR har utvecklats och protokoll för extraktion av DNA från rötter har utvecklats och resultaten redovisas i slutrapport H0960323 och i Almquist et al., (2016). Kortfattat har vi utifrån tidigare publicerade realtids-PCR metoder utvecklat kvantitativa realtids-PCR-metoder med TaqMan-prober för de fyra patogenerna samt en universal växtgen (Tewoldemedhin et al. 2011, Waalwijk et al. 2004). Plasmidstandarder baserade på syntetiska sekvenser har tagits fram för att möjliggöra kvantifiering av antalet kopior av respektive gen. Nivån av respektive patogen uttrycks som antal kopior per 1 000 000 kopior av växtgenen. Då kopietalet för de olika målsekvenserna inte är känt (i vissa fall flerkopiegener) går det inte att direkt jämföra nivåerna mellan patogenerna. Rutiner för extraktion av rötter har utvecklats. Efter provtagning tvättades rötterna i kranvatten och förvarades sedan i fryskyl (-18° C) till analysstillfället. Minst 10 rötter per ruta (fler vid de tidigaste provtagningarna) klipptes i mindre bitar för hand med en sax (insåningsåret) eller mixades i en Retsch Grindomix knivmixer (Retsch®) vid 10 000 rpm m-1 i 20 s, och därefter vägdes 100 mg av rotmixen från varje prov i ett Matrix A rör. DNA extraherades därefter från två delprov, med FastDNA SPIN Kit, MP Biomedicals. Samtliga analyser har utförts i molekylärlaboratoriet vid avd f Precisionsodling och Pedometri, SLU, Skara

### 2.3 Fälttest av sortmaterial i naturligt infekterad jord

Försöket i Götene (58°N, 13°E) beskrivs i slutrapport H0960323 avslutades 2013 som andraårsvall då klöverbeståndet var extremt försvagat. Plantor grävdes upp för analys den 16 juni och sedan avbröts försöket av försöksvärden. Ett nytt fältförsök anlades 5 juni 2013 på Kvinnersta, Örebro (59°N, 13°E) med följande marknadssorter: SW Ares (2n), SW Nancy (4n), SW Ally (4n), SW Vivi (4n), SW Dagny (4n), SW Vicky (4n), SSD Global (4n), SSD Titus (4n), SSD Rajah (2n), SSD Ostro (4n), SSD Laurus (4n), SSD Callisto (2n), SSD Bilzard (4n). Sorterna valdes i samråd med förädlare vid Lantmännen Lantbruk och representanter för Scandinavian Seed. Försöken har utförts av Hushållningssällskapet Skaraborg och HS Konsult AB. Ingen gödsling eller skörd har utförts utan parcellerna putsades vid ordinarie skördetillfälle motsvarande ett två skördesystem och det skördade materialet bortfördes. Klöverfröerna 8 kg/ha av diploid (2n) och 10 kg/ha av tetraploid (4n) sort såddes tillsammans med timotej, SW Switch, 7 kg/ha med korn som insåningsgröda. Försöksdesignen var densamma som för Göteneförsöket, förutom att halva ytan i varje parcell lämnades oputsad, och 10 plantor grävdes upp slumpvis i båda hälfterna av samtliga rutor. Sista provtagningen gjordes i maj 2016 (vallår 3), därefter gick det inte att hitta plantor. Realtids PCR- analys utfördes på SW Ally, SW Vivi och SW Dagny och här användes samma rötter som graderats. Provtagning gjordes två gånger årligen; 29 juni och 26 augusti, 2013, 24

april och 20 november 2014, 22 april och 11 oktober 2015, 3 maj (endast tre sorter) och 5 november 2016. Skotten skars av och rötterna tvättades, och yttre respektive inre angrepp av rotröta graderades enligt Rufelt (1986).

### 3.1 Platsvisa provtagningar

För att få en uppfattning om sjukdomsbilden i olika delar av landet insamlades prover från tre utvalda sorter i befintliga sortförsök i Lilla Böslid, Halland (Nancy, Rozeta, Titus), Bjertorp (Ares, Nancy, Vicky) och Rådde (Nancy, Rozeta, Titus) i Västergötland och Lännäs (Ares, Torun, Yngve) i Ångermanland från vallår 2 (2014) och vallår 3 (2015). Provtagning, gradering och realtids-PCR analyser utfördes enligt beskrivning ovan.

## 3. Resultat

### 3.1 Studier av infektionsförloppet i obehandlat och värmebehandlat utsäde

#### 3.2.1 Isolering av patogena svampar från rödklöverutsäde 2013 och 2014

Resultatet visar att samtliga utsädespartier som undersöktes 2013 var infekterade med *Fusarium* spp. Infektionen varierade från 2 till 30 % och var signifikant skild mellan samtliga partier (tabell 1). Utsädesbehandling med Thermo Seed™ minskade infektionen kraftigt, och endast ett frö med *Fusarium* spp kunde isoleras från det mest infekterade Nancypartiet (1288).

Tabell 1. Groning och infektion av rödklöverpartier med *Fusarium* spp 2013 och 2014.

Rödklöver- utsädespartier	Obehandlade			TS-behandlade		
	infektion %	Groning – filtrer- papper %	Groning – jordtest %	infektion %	Groning – filtrer papper %	Groning – jordtest %
<b>2013</b>						
SW Nancy (1294)	16c	82	75a	1	66	64a
SW Nancy (1298)	30d	28	42bc	1	22	21b
SW Nancy (1287)	2a	80	69a	0	90	72a
SW Ares (1019)	6b	72	69a	0	96	69a
<i>p</i> (infektion %)	0,001			0,001		
<i>p</i> (groning-jordtest)			ns (0,05)	ns		Ns
<b>2014</b>						
SW Vicky (1574)	1a	66	49b	0	82	65abc
SW Vicky (1575)	0a	86	53ab	0	84	57ab
SW Nancy (1633)	4ab	74	62abc	0	82	55ab
SW Ares (1570)	2a	98	72a	0	96	77c
SW Ares (1633)	2a	82	54ab	0	90	68c
<i>p</i> (infektion %)	ns			ns		
<i>p</i> (groning-jordtest)			ns			Ns

TS-behandlingen har minskat groningsförmågan i klöverpartierna med högst infektion; SW Nancy (1294) och SW Nancy (1288) dock ej signifikant. Analyserna på filtrerpapper medger inte statistisk bearbetning. 2014 var infektionen av *Fusarium* spp svag och varierade från 0 till 4 % infekterade frön. TS-behandlingen minskade angreppet till noll. Grobarhetsanalyser (tabell 1) visar att TS-behandlingen har ökat grobarheten för tre partier och en liten minskning noteras för två partier. Jordanalyserna ger generellt en lägre grobarhet jämfört med pappersmetoden.

#### 3.2.2 Fältförsök med Thermo Seedbehandlade frön

TS-behandlade frön hade lägre fältuppkomst jämfört med kontrollerna båda åren men skillnaderna var inte signifikanta (Tabell 2). Antalet plantor m<sup>-2</sup> ökade vid den andra avläsningstidpunkten båda åren för både obehandlade och TS-behandlade led med från 15 till 25 %. Uppkomsten var lägre 2014 då temperaturen översteg +30° C under juli månad.

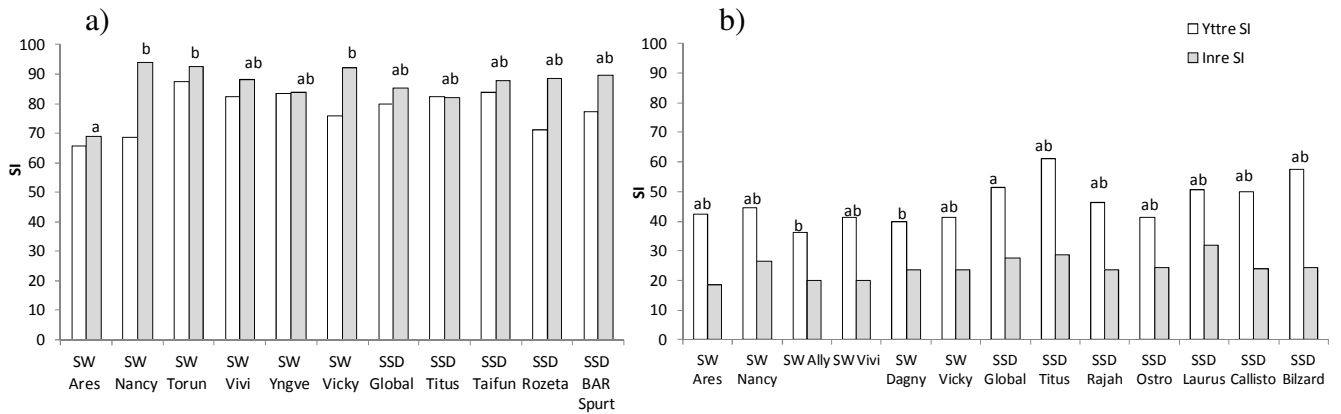
Tabell 2. TS- och obehandlade utsädespartier av rödklöver; fältuppkomst 2013 och 2014 antal plantor m<sup>-2</sup>

2013	Plantor m <sup>-2</sup>		Skillnad (%)	2014	Plantor m <sup>-2</sup>		Skillnad (%)
	26-jul	22-aug			4-aug	17-sep	
Sort				Sort			
Ares 1019	129	156	23	Ares 1570	104	114 a	10
Nancy 1287	120	145	27	Ares 1638	84	112 a	31
Nancy 1288	90	117	24	Nancy 1633	98	112 a	14
Nancy 1294	133	158	21	Vicky 1574	76	88 a	16
<i>p</i> (sort)	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	Vicky 1575	76	89 a	17
Fröbehandling				<i>p</i> (sort)	<i>ns</i>	0,04	<i>ns</i>
Obehandlat	123	150	22	Fröbehandling			
Thermo Seed	112	138	25	Obehandlat	89	106	19
<i>p</i> (fröbeh)	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	Thermo Seed	86	99	15
<i>p</i> (sort x fröbeh)	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>p</i> (fröbeh)	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>CV</i>	27,1	21,3	19,1	<i>p</i> (sort x fröbeh)	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
				<i>CV</i>	44,4	22,5	183,9

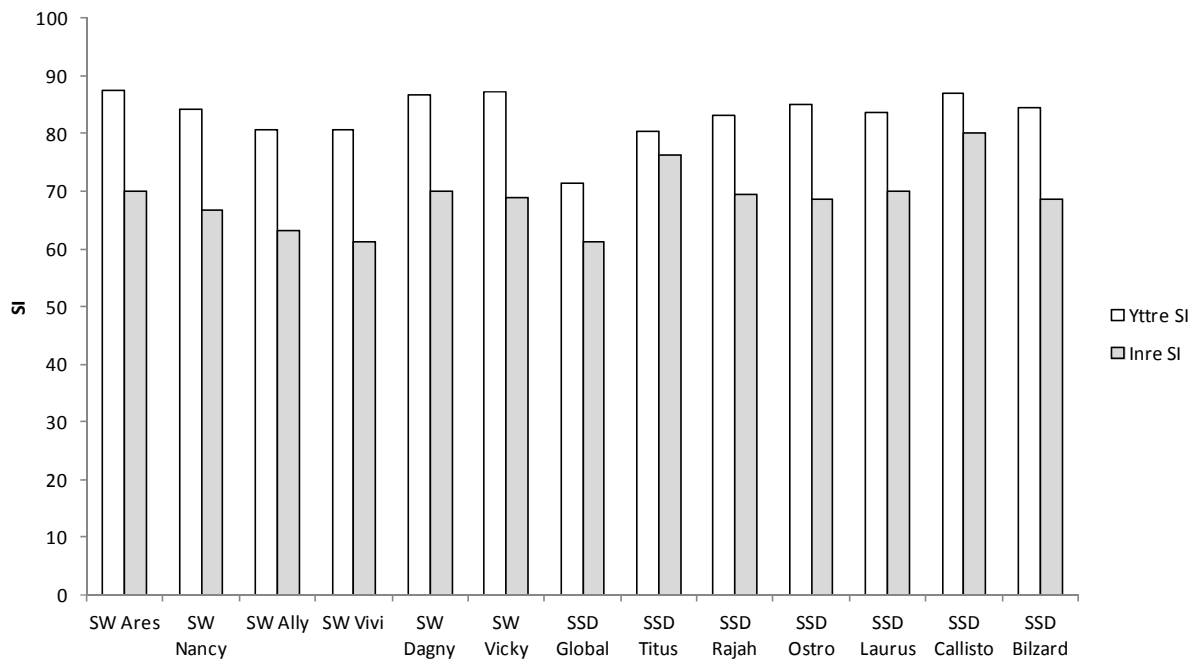
I försöket som anlades 2012 grävdes som plantor och för graderades för rotträta. Då inga signifikanta skillnader hittades mellan partier eller mellan behandlingar utfördes inte detta moment 2013 och 2014. Sjukdomsindex var i medeltal 20 för obehandlade partier och 22 för TS-behandlade.

### 3.3 Fälttest av sortmaterial i naturligt infekterad jord

Mottagligheten hos 18 olika sorter för rotträta utvärderades i två fältförsök i Mellansverige. Sjukdomsindex för rötter graderade på våren vallår 2 visas i figur 1. Signifikanta skillnader hittades för yttre sjukdomsindex  $SI_y$  i Götene där SW Ares visade signifikant lägre sjukdomsindex (69) jämfört med SW Nancy (94) och SW Torun (93) och SW Vicky (92) och på Kvinnersta visade SW Titus signifikant högre inre sjukdomsindex,  $SI_i$  (61) jämfört med SW Ally (36) och SW Dagny (40). Skillnaderna var generellt små i mottaglighet mellan sorterna. När sorterna grupperas efter ploiditet visar tetraploida sorter (4n) signifikant högre  $SI_i$  jämfört med diploida sorter (2n) i Götene 89 jämfört med 83,  $p < 0,050$ ). På Kvinnersta hittades inga signifikanta skillnader (data visas ej här). Realtids-PCR analyserna av tre utvalda sorter på varje försöksplats; SW Torun, SW Vivi och SW Yngve i Götene och SW Ally, SW Vivi och SW Dagny i Kvinnersta visade endast små skillnader vid tre provtagningstidpunkter i Götene. I augusti insåningsåret visade SW Yngve signifikant lägre nivå av *F. avenaceum* jämfört med de andra sorterna ( $p < 0,050$ ). En månad senare fanns den lägsta nivån av *F.avenaceum* i SW Torun. I juni vallår 1 visade SW Torun och SW Yngve signifikant lägre nivåer jämfört med SW Vivi ( $p < 0,010$ ). Inga skillnader i antal genkopior av *Phoma* spp och *C.destructans* fanns vid någon av provtagningarna. Vid slutgraderingen vallår 3 på Kvinnersta fanns inga signifikanta skillnader mellan sorterna för  $SI_y$  eller  $SI_i$  (Figur 2). I medeltal var  $SI_y$  83 och  $SI_i$  69 samtidigt som 100 % av rötterna var angripna.



Figur 1. Sjukdomsindex (SI) för yttre och inre skador på a) Götene och b) Kvinnersta vallår 2.

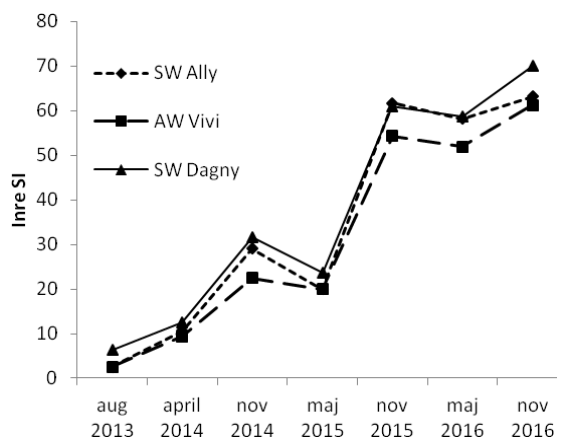


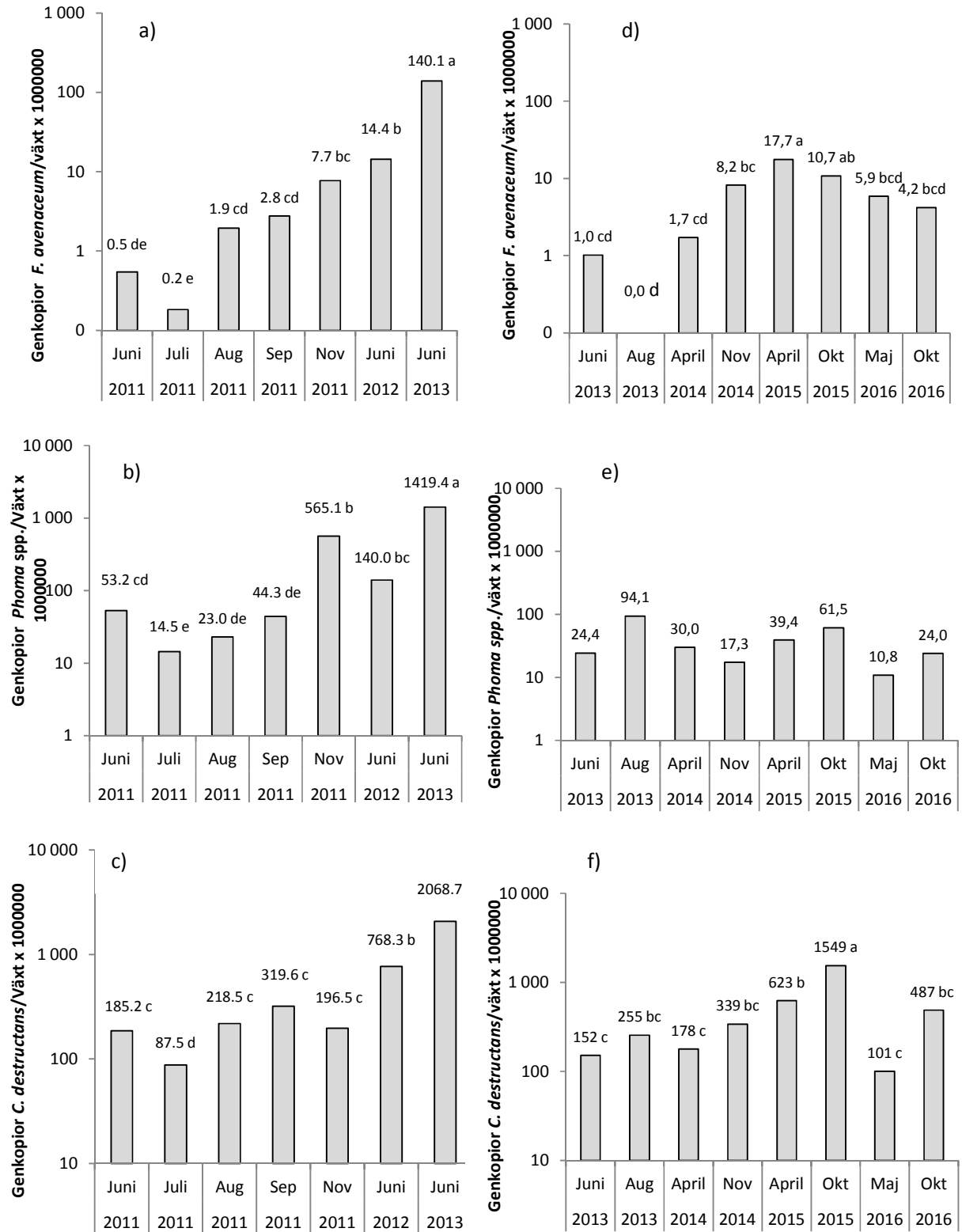
Figur 2. Sjukdomsindex (SI) för yttre och inre skador i 13 rökklöversorter i Kvinnersta vallår 3 november 2016.

### 3.3.1 Sjukdomsutveckling över tid

Inre sjukdomsindex (SI<sub>i</sub>) för tre utvalda sorter SW Ally, SW Vivi och SW Dagny visas över tid från insåningsåret 2013 till vallår 3 2016 på Kvinnersta i figur 3. Mängden genkopior av de olika sjukdomarna från plantprovtagningar över tid redovisas i figur 4.

Figur 3. Sjukdomsutveckling (SI<sub>i</sub>) under tre vallår i tre rökklöversorter; SW Ally, SW Vivi och SW Dagny, Kvinnersta 2013-2016.

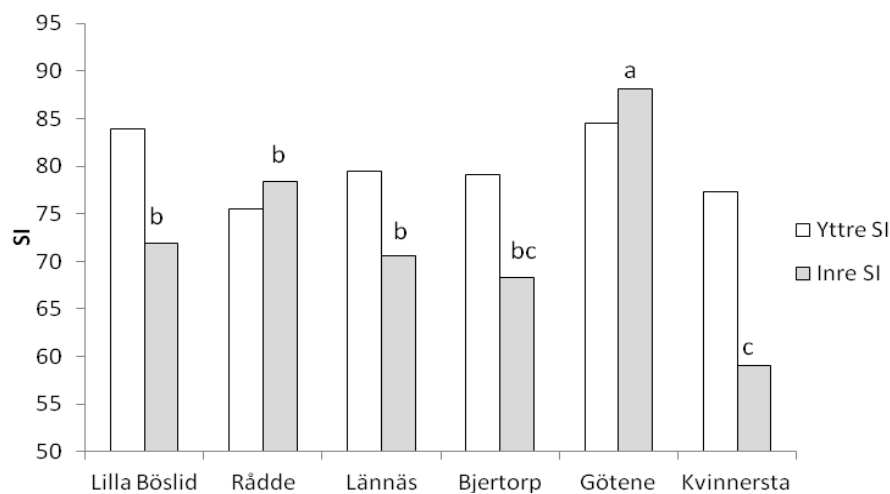




Figur 4. Sjukdomsutveckling över tiden visat som mängd genkopior av respektive patogen vid olika tidpunkter på i Götene a), b) och c) och på Kvinnersta d), e) och f). Varje stapel visar medelvärde av tre rödklöversorter, SW Torun, SW Vivi och SW Yngve på Götene och SW Ally, SW Vivi och SW Dagny på Kvinnersta från fyra upprepningar (n = 12). Olika bokstäver visa statistiskt signifikanta skillnader mellan tidpunkt enligt Tukey's HSD test vid  $p > 0,05$ .

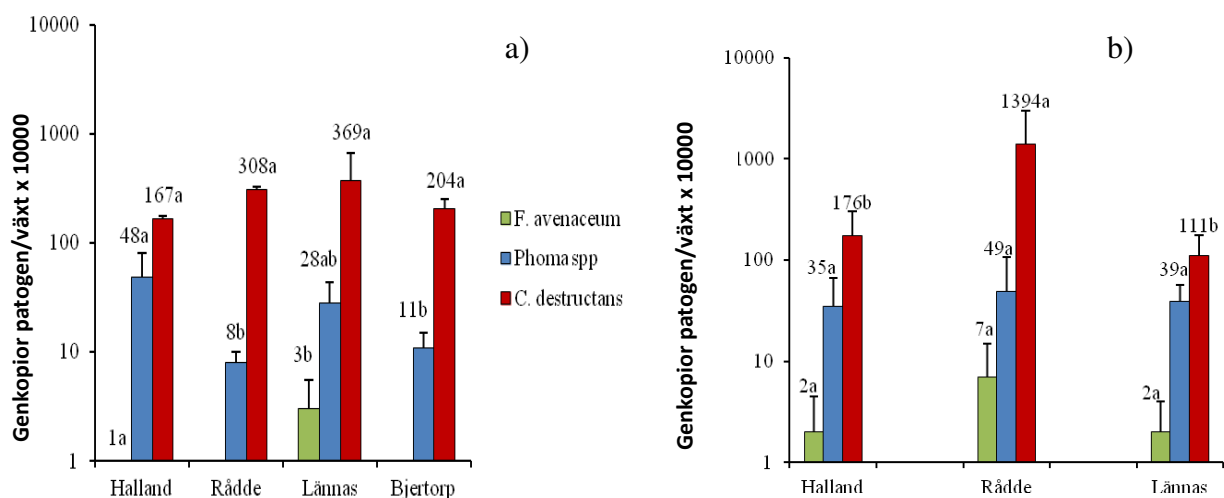
För att undersöka sjukdomsutveckling över tid, grävdes plantor upp vid ett antal tidpunkter i Götene insåningsåret och därefter två gånger årligen som i Kvinnersta. DNA från *F. avenaceum*, *Phoma* spp och *C.destructans* detekterades vid i stortsett samtliga tidpunkter (Figur 4). Motsvarande graderingar av sjukdomsindex har gjorts (resultat visas ej här). Signifikanta skillnader i mängd detekterad svamp DNA hittades inom eller mellan protvagningsår för de tre patogenerna på båda försöksplatserna med undantag för *Phoma* spp i Kvinnersta där inga signifikanta skillnader fanns. I Götene fanns de högsta nivåerna i rötter i juni vallår 2, liksom för *C. destructans* i Kvinnersta. Analyserna från vallår 3 på Kvinnersta, (figur 4 d-f) visar generellt lägre nivåer jämfört med vallår 2.

### 3.3.2 Jämförelse av sjukdomstryck mellan olika försöksplatser



Figur 5. Sjukdomsindex (SI), yttre (Y) och inre (I) i plantor från olika platser vallår 2, plantorna provtogs våren 2013 i Götene och övriga hösten 2014. Olika bokstäver visar signifikanta skillnader mellan platserna, a, b och c för SI<sub>I</sub> ( $p < 0,001$ ), inga skillnader fanns för SI<sub>Y</sub> enligt Tukey's test trots att  $p = 0,040$

Det fanns inga signifikanta skillnader mellan sorter (resultat visas ej här) vare sig beträffande sjukdomsindex eller antal genkopior av respektive svamp. Tydliga skillnader fanns i SI<sub>I</sub> mellan platser (Figur 5) där SI<sub>I</sub> var signifikant högst i Götene och lägst i Kvinnersta.

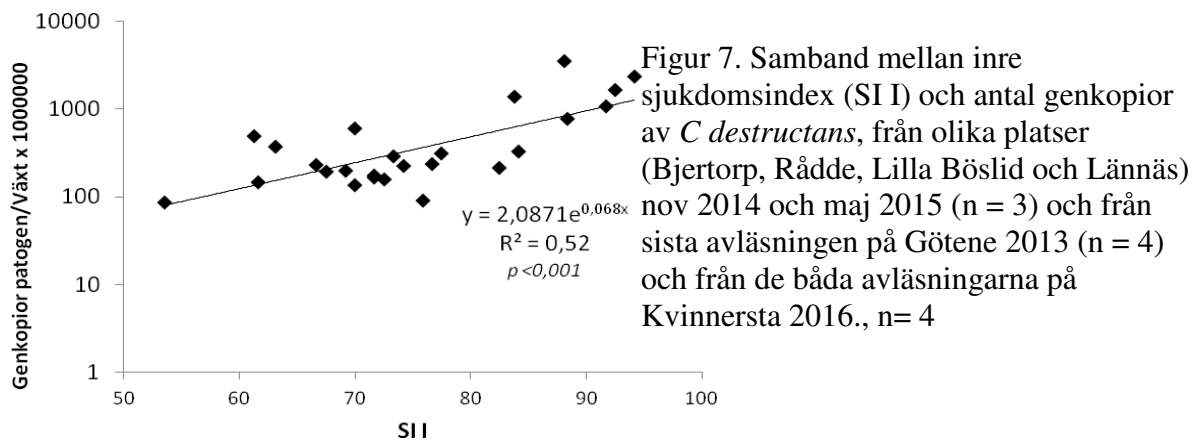


Figur 6. DNA analys av *F. avenaceum*, *Phoma* spp och *C. destructans* (a) vallår 2, 2014 och (b) vallår 3, 2015. Medel tal av tre sorter; Lilla Böslid, Halland; SW Nancy, Titus SsD och Rozeta SsD, Rådde; SW Nancy, Rozeta SsD, Titus, SsD Lännäs; SW Yngve, SW Ares, SW Torun och Bjertorp; SW Vicky, SW Ares och SW Nancy.

Antalet genkopior av *Phoma* spp var signifikant högst i Lilla Böslid, Halland 2014, medan inga signifikanta skillnader fanns 2015 (figur 6). *F. avenaceum* påträffades endast i Lännäs 2014, men återfanns på Lilla Böslid, Rådde och i Lännäs 2015. Försöksplatsen i Bjertorp avslutades efter vallår 2 därför finns inte data för 2015. I Rådde var halten högst av samtliga patogener 2015 och *C.destructans* är signifikant högre än i Lilla Böslid och Lännäs.

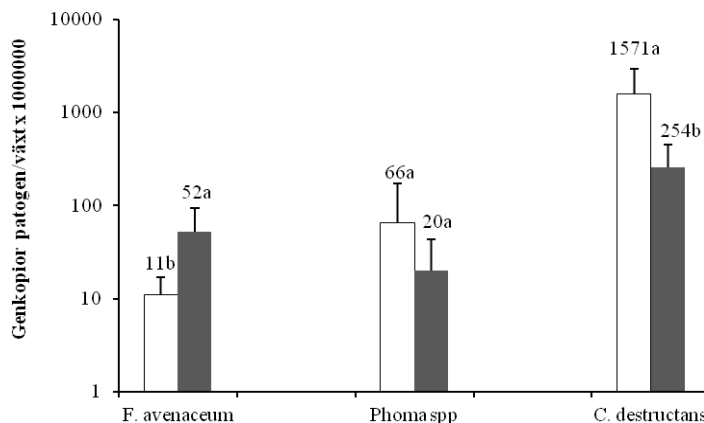
### 3.3.3 Samband mellan patogen DNA och sjukdomsindex

Det fanns signifikanta samband mellan  $SI_i$  och mängd patogen, starkast var sambandet med *C. destructans* (fig 7).  $R^2$  värdet mellan  $SI_i$  och *F. avenaceum* respektive *Phoma* spp, var 0,22 ( $p= 0,03$ ) och 0,26 ( $p=0,005$ ). Regressionsanalysen visar signifikant linjärt samband då skalan för antalet genkopior för patogenen är logaritmerad där  $y=2,0871e^{0,065x}$  ( $R^2=0,52$ ,  $p<0,001$ ).



### 3.3. 4 Effekter av putsning

För att undersöka inverkan av åputsning på sjukdomsutvecklingen, grävdes rötter upp också från del av rutan som lämnats oputsad. Rötterna graderades för sjukdomsindex vallår 1 och vallår 2 (Almquist et al., 2016a). Vallår tre fanns inga rödklöverplantor.



Figur 8. Skillnad mellan putsat (öppna staplar) och oputsat (fyllda staplar) i antal DNA kopior av *F. avenaceum*, *Phoma* spp och *C. destructans* i Kvinnerstaförsöket maj vallår 2 2015. Medelvärden av tre utvalda sorter, SW Ally, SW Vivi och SW Dagny. Olika bokstäver visar signifikanta skillnader mellan putsat och oputsat för varje svamppatogen enligt t-test ( $p<0.05$ ).



Tabell 3. Skillnader av yttre och inre sjukdomsindex (SI) mellan putsade och oputsade plantor vid två tillfällen 2015 i Kvinnersta vallår 2.

	Maj 2015		Okt 2015	
	Yttre SI	Inre SI	Yttre SI	Inre SI
Oputsad	44	24	59 b	51 a
Putsad	46	24	77 a	59 b
<i>p</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<0,001	0,006

Vallår två var SI<sub>i</sub> signifikant högre i oputsade led (tabell 3) och mellan *C.destructans* och *F.avenaceum* fanns signifikanta skillnader (Figur 8).

#### 4. Diskussion

Rotröta hos rödklöver påverkar uthålligheten i slåttervallar, och när andelen rödklöver minskar som följd av svag uthållighet (Wallenhammar et al., 2008) leder detta till att vallarna bryts i förtid. De svampar som orsakar rotröta har undersökts tidigare och omfattar släktet *Fusarium* där *F. avenaceum* och stammar av *F. culmorum* anses vara den främsta orsaken till rotröta i rödklöver tillsammans med *Cylindrocarpon destructans*, och *Phoma exigua* (Rufelt, 1986, Lager och Gerhardson, 2002, Wessén, 2006, Öhberg, 2008). I den här undersökningen har vi följt dessa patogener och i enlighet med hypotes i) och visat att de utvecklade reallids-PCR metoderna (Almquist et al., 2016a) effektivt beskrivit att mängden svamp- DNA förändras över tid. DNA analyserades innan synliga symtom fanns tidigt under insåningsåret (Figur 4 a-c). DNA-analyserna visade att *C. destructans* förekommer redan vid första provtagningen (Figur 4 a och d) och *Phoma* spp. (primrarna detekterar både *P. medicaginis* och *P. exigua*) förekom i låga nivåer från första provtagningen (fig 4b) och ökade till betydligt högre nivåer under hösten i Götene. *F. avenaceum* däremot detekterades sporadiskt under sommaren och ökade något under hösten. *F. culmorum* detekterades endast mycket sporadiskt under hela analysperioden på samtliga försöksplatser, och kan inte anses vara del av komplexet. Vi har visat att *C. destructans* troligtvis är den svamp som till störst del orsakar rotrötans utveckling genom starkast samband (Figur 7) mellan DNA-mängd av *C. destructans* och visuell sjukdomsgradering. *C.destructans* är den viktigaste rotpatogenen i ginsengodlingar i Nordamerika (Rahman & Punja, 2005) och här finns mycket kunskap att hämta då likheten mellan rötter av ginseng och rödklöver är stor. Fenoliska substanser i rötterna stimulerar ett enzym som bryter ner rotvävnaderna i ginseng och ger roten ett urgröpt hålrum, något som är vanligt i kraftigt angripna rödklöverrötter. *C. destructans* har allmänt ansetts vara en svag patogen (Rufelt, 1986) och är svår att isolera då den ofta blir överväxt av *Fusarium* spp. (Rahman & Punja, 2005). Därtill förekommer olika känslighet hos isolat av *C.destructans*, och det finns nu ett stort behov av att undersöka virulensen hos svenska isolat. Nivån av *C.destructans* var högst på platser med känd förekomst av omfattande rödklöverodling, Götene och Rådde (Figur 3 a och 6 b). Putsningen ökade anreppet av rotröta signifikant, och mellan *C.destructans* och *F.avenaceum* fanns signifikanta skillnader (Figur 8) i enlighet med hypotes v). Thermo Seedbehandling sanerade effektivt utsädesmitta av *Fusarium* spp. (Tabell 1) men hade ingen effekt på sjukdomsutveckling eller uppkomst i fältförsök, och erfarenheterna från Lager och Johnsson (2002) kunde inte upprepas.

#### Tack

Tore Dahlquist för leverans av utsädespartier, Linda Öhlund och Johan Klingspor för utsäde till testsortiment, Josefine Wallenhammar för fältarbete och graderingar, Kristina Nordström och Åsa Fransson för extraktioner. Del av projektet har finansierats av TEMA-projektet BioSoM (Biologisk markkartering), SLU, avd f Precisionsodling och Pedometri Skara.

## Resultatförmedling

Farmers University, Kulturcentret, Järna. 30 deltagare, lantbrukare och rådgivare, 6 augusti 2013, Greppa Näringen, fortbildning 30 rådgivare, november 2013, Linköping, Uddevalla möte, rådgivare, handel och forskare, 150 deltagare, januari 2014; Vallkonferens, SLU, februari 2014, rådgivare och forskare 300 deltagare; Seminarium Brunby Lantbrukardagar juli 2015, lantbrukare och rådgivare 50 deltagare, Grundkurs Regenerativt Lantbruk, Lovön, mars 2015, lantbrukare 25 deltagare, Ekologiska Lantbrukarna, årsstämma, Järna mars 2016, lantbrukare 50 deltagare, Örebro läns vallförening, Hallsberg, mars 2016, 25 lantbrukare Disputation 9 april, SLU, Uppsala 20 forskare; EGF 4-6 september, Trondheim, Norge, muntlig presentation forskare och rådgivare, 400 deltagare; Ämnesgrupp vall, november 2016, Linköping, rådgivare och forskare 30 deltagare.

## 5. Slutsatser

Vallproducenter har under många år drabbats av svag uthållighet hos rödklöver. Vi har utvecklat och använt analysmetoder som visar att de jordbundna patogena svamparna *Fusarium avenaceum*, *Cylindrocarpon destructans* och *Phoma medicaginis* finns i roten kort efter sådd. Med tiden ökar halten av svamparna och vi har visat ett starkt samband mellan angripen rotyta och DNA-mängd av *C.destructans*. Tydliga platsvisa skillnader finns i angreppsnivå och de största och snabbast ökande skadorna finns på fält där rödklöver återkommer ofta. Utsädesburen smitta kan saneras med värmebehandling, men har sannolikt liten betydelse för rot infektionen.

## 6. Publikationer

Almquist, C. 2016. Monitoring Important Soil-Borne Plant Pathogens in Swedish Crop Production Using Real-Time PCR. Doctoral thesis No. 2016:26, Swedish University of Agricultural Sciences.

<http://pub.epsilon.slu.se/13060/>

Almquist C., Stoltz E. och Wallenhammar A.-C. 2016b Incidence of root pathogens associated to clover root rot in Sweden. *Grassland Science in Europe* 21, 786–788

Wallenhammar, A-C., Nilsson-Linde, N., Jansson, J and Almquist, C. 2014. Rotröta utmanar rödklövern. *Arvensis*, 1, 22-23.

Wallenhammar A.-C., Nilsson-Linde N., Jansson J. och Stoltz E. (2014) Rotröta påverkar uthålligheten hos vallbaljväxter. Vallkonferens 2014. Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för växtproduktionsekologi. Rapport 18, 55–58.

## 7. Referenser

Almquist, C, Wallenhammar, A-C, Stoltz, E och Sundström, J, F. 2016a. Monitoring disease development caused by soil-borne plant pathogens associated with root rot in red clover (*Trifolium pratense*) crop stands using quantitative real-time PCR (Manuscript).

Almquist C., Stoltz E. och Wallenhammar A.-C. 2016b Incidence of root pathogens associated to clover root rot in Sweden. *Grassland Science in Europe* 21, 786–788.

Lager, J & Johnsson, L. 2002. Seed-borne fungi affect field emergence in red clover. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 109 (4), 350-356.

Rahman, M., Punja, Z., K. 2005. Factors Influencing Development of Root Rot on Ginseng Caused by *Cylindrocarpon destructans*. *Phytopathology*, 95, 12, 1381-1390.

Rufelt, S. 1986. Studies on fusarium root rot of red clover (*Trifolium pratense* L.) and the potential for its control. SLU. Växtskyddsrapporter, Avhandlingar 10.

Tewoldemedhin Y., Mazzola M., Mostert L.m McLeod A. 2011. *Cylindrocarpon* species associated with apple tree roots in South Africa and their quantification using real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology* 129:637-

Waalwijk C., van der Heide R., de Vries I., van der Lee T., Schien C., Costrel-de Corainville G., Häuser-Hahn I., Kastelein P., Köhl J., Lonnet P., Demarquet T., Kema G. 2004. Quantitative detection of *Fusarium* species in wheat using TaqMan. *European Journal of Plant Pathology* 110:481-494.

Wallenhammar, A-C. 2010. Field Surveys of *Fusarium* root rot in Swedish organic red clover leys and susceptibility tests of Nordic cultivars. In: NJF Seminar 432. The potential of forage legumes to sustain a high agricultural productivity. Hvanneyri, Iceland, 20-22 June 2010.

Wallenhammar, A-C., Nilsson-Linde, N., Jansson, J., Stoltz, E. and L- Bäckström, G-. 2008. Influence of root rot on the sustainability of grass/legume leys in Sweden. 22<sup>nd</sup> meeting of the European Grassland Federation, Uppsala, June 9-12<sup>th</sup>, 2008. *Grassland Science in Europe* 13.

Wessen, G. 2006. Root rot in red clover (*Trifolium partense* L.). Uppsala, Sweden: SLU, Examensarbete.

Öhberg, H. 2008. Studies of persistence of red clover cultivars in Sweden, Uppsala, SLU, Doktorsavhandling.

