

Slutrapport för SLF projekt H0960323

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

Ann-Charlotte Wallenhammar¹, Charlotta Almquist², Eva Stoltz¹ och Zahra Omer¹
¹HS Konsult AB, ²Eurofins Testing Sweden AB

Bakgrund

Rödklöver (*Trifolium pratense* L.) är en av de viktigaste proteingrödorna i svensk mjölkproduktion och utgör motorn i ekologiska växtodlingssystem (Wallenhammar & Anderson, 2002). Den svaga uthålligheten hos rödklöver är ett stort problem i produktionen och minskningen i klöverhalt över tiden i rödklöver-gräsvallar är påtaglig (Frankow-Lindberg, 1989; Nykänen *et al.*, 2000, Wallenhammar *et al.*, 2008). Försvagningen av rödklöverplantorna orsakas av rotröta, där patogena svampar bl.a. ur släktet *Fusarium*, *Cylindrocarpon destructans*, *Phoma medicaginis* var *pinodella* ingår (Rufelt, 1986). Rotrötans stora utbredning i landets vallar visades av Rufelt (1986), och omfattande angrepp kartlades i ekologiska vallar i Syd- och Mellansverige (Wallenhammar *et al.*, 2005). Problembilden och behovet av att karaktärisera av jordens mykoflora förstärks av att de mest patogena *Fusarium*-svamparna *F. avenaceum* och *F. culmorum* dessutom kan angripa och uppförkas i flera olika baljväxter, vallgräs och vete. (Lager och Gerhardson, 2002, Chang *et al.*, 2004). Förutom problem med uthålligheten har odlare under senare år också haft svårt att etablera både slåtter- och grüngödslingsvallar, vilket kan orsakas dels av jordbundna svampar, dels av utsädesburna svampar, där *P. medicaginis* dominerade i en tidigare pilotstudie (Lager och Johnson, 2002). Resistensförädling av sorter med egenskaper som motståndskraft mot dessa jordbundna patogener är huvudspåret för att förbättra uthålligheten (Gae och Ingversen, 2003), men en undersökning av nordiska marknadssorter av rödklöver visade inga skillnader i mottaglighet (Wallenhammar, 2010). Vallfröutsädet kan vara en källa till infektion, och eftersom sundhetsundersökningar inte görs vid certifiering är kunskapen begränsad. Problem med låga grobarheter orsakade av stor andel abnorma groddar är inte ovanliga. Abnormiteterna orsakas ofta av svampar som finns på utsädet. Lager och Johnsson (2002) isolerade *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. och *Phoma* spp. från två veckor gamla groddplantor, och efter värmebehandling med Thermoseedmetoden (Forsberg, 2004) ökade fältuppkomsten med 38 %. Upphetningen kan också medföra att antalet hårda frön reduceras, och att partiet får en snabbare och jämnare groning.

Arbetshypoteser och målsättning

Syftet är att förbättra odlings säkerheten och behålla en långsiktigt hög produktionsnivå i rödklövervallar genom att utveckla metoder för kvantitativ specifik bestämning av de patogener som orsakar rotröta i rödklöver. För att säkerställa etableringen och fröproduktionen undersöks betydelsen av sanering av utsädesburna patogener med Thermoseedbehandling. Våra hypoteser var att i) med utvecklad qPCR—teknik kan vi diagnosticera klöverpatogener i rötter och jord och följa etablering av och det epidemiologiska förloppet hos olika patogener ii) mottaglighet hos olika sorter kan effektivt utvärderas med qPCR iii) kvaliteten av rödklöverfrö kan förbättras genom värmebehandling, iv) med utvecklade metoder enligt ovan kan patogenförekomsten i olika delar av landet bestämmas.

2. Metodik

2.1

Uppsättning och utvärdering av analysmetoder med PCR-teknik

Utgångspunkten för uppsättningen av de molekylärbiologiska analyserna har varit i litteraturen beskrivna metoder som sedan har anpassats till tillgänglig PCR-teknologi och den senaste kunskapsutvecklingen.

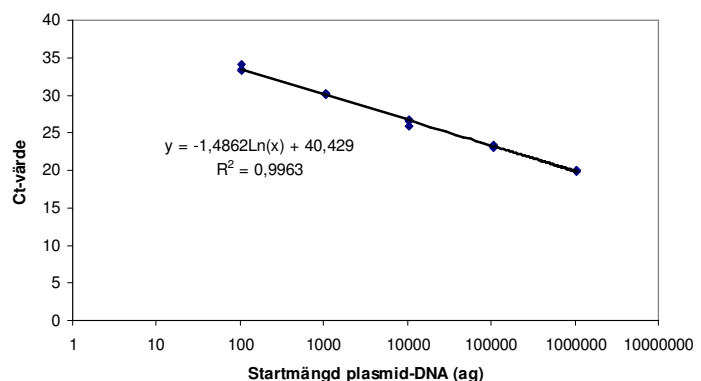
Detektion av *P. exigua* med Realtids-PCR

Analysmetoder med Realtids-PCR för tre olika patogener på potatis, däribland *P. exigua* och varianterna *P. foveata* och *P. exigua* har tagits fram av Cullen et al. (2007). Metoden är visserligen kvantitativ, men endast då patogenen detekteras i potatis eftersom man utnyttjat relativ kvantifiering med en gen från potatis som referensgen. För att kunna kvantifiera *P. exigua* i rötter från klöver och i jord har detektionsmetoden utvecklats och anpassats ytterligare för att kunna tillämpa absolut kvantifiering. Sekvensen som amplificeras av primerparet (ribosomalt DNA) har tillverkats syntetiskt och därefter satts in i en plasmid (cirkulärt bakteriellt DNA). Spädningsserier av plasmidextraktet kan då analyseras och användas som standard vid studier av prover med okänt innehåll.

Realtids-PCR metoden har utvärderats genom att analysera tiofaldiga spädningsserier av ett *P. exigua* isolat från Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 119,94) samt *P. exigua* plasmidstandard. DNA från isolatet gav detektion med metoden och en spädningsserie av extraktet visade att metoden var linjär ($R^2=0,9998$) och hade bra amplifieringseffektivitet. För kvantitativa PCR-analyser bör effektiviteten ligga mellan 90 och 110 %, där 100 % innebär att det sker en fullständig fördubbling av PCR-produkten i varje temperaturcykel. Det första testet av primrarna resulterade i en amplifieringseffektivitet på 93 %. Även standarden hade hög amplifieringseffektivitet och $R^2>0,99$.

Metoden lämpar sig mycket väl för kvantitativa analyser. Exempel på en standardkurva visas i Figur 1.

Figur 1. Exempel på en standardkurva för *P. exigua*. Varje tiofaldig spädning har analyserats med Realtids-PCR i tre replikat. Kurvan som anpassades till mätpunkterna gav en mycket hög korrelationsfaktor ($R^2>0,99$) och PCR-effektiviteten beräknades till



Detektion av *F. culmorum* med Realtids-PCR

Två olika primerpar för detektion av *F. culmorum* har utvärderats (Cullen et al. 2005, Waalwijk et al. 2004). Primers och prob framtagna av Waalwijk et al. (2004) har fungerat bäst och en standard har tagits fram på samma sätt som för *P. exigua*. Primrarna baseras på ett RAPD (random amplified polymorphic DNA) fragment. Motsvarande 3 DNA-kopior av standarden kunde detekteras.

Detektion av *F. avenaceum* med realtids-PCR

Tre olika primerpar (Waalwijk et al 2004, Cullen et al. 2005, Nicolaisen et al. 2009) för detektion av *F. avenaceum* har utvärderats med SYBR Green på DNA från isolat CBS 408.86. SYBR Green är en fluorescerande färg som binder in till dubbelsträngat DNA och möjliggör analys med realtids-PCR utan prob. Detta system kan vara särskilt användbart i ett första skede för att utvärdera och jämföra olika primerpar. Primerparet framtaget av Waalwijk et al. (2004) valdes och en standard har tagits fram på samma sätt som tidigare.

Detektion av *C. destructans* med realtids-PCR

Ett primerpar framtaget av Tewoldemedhin et al. (2011) har utvärderats med SYBR Green på DNA från infekterade rötter. En prob och en standard har utvecklats och metoden har även utvärderats på ett CBS isolat (940.97).

Detektion av universal växtgen med realtids-PCR

En metod för en universal växtgen (COX) har satts upp och denna referensgen kommer att analyseras i växtprover för att kunna normalisera de kvantitativa värdena.

DNA extraktion från rötter och jord

Vi har använt ett kommersiellt kit anpassat för växtmaterial vid extraktion av DNA från rötter (FastDNA SPIN Kit, MP Biomedicals) samt ett kit anpassat för jord vid analys av jordprover (FastDNA SPIN Kit for Soil, MP Biomedicals). FastDNA SPIN Kit for Soil har tillsammans med två olika reningskit använts framgångsrikt vid analys av bl.a. *P. brassicae* som orsakar klumprotsjuka i oljevaxter (Wallenhammar et al., 2012). Klövrerötter som ska analyseras tvättas först i kranvatten och mixas sedan i en knivmixer innan delprov tas ut för DNA-extraktion.

2.2 Studier av infektionsförloppet i obehandlat och värmebehandlat utsäde

Fem utvalda fröpartier med låg grobarhet, dvs. mellan 67 % och 76 %, med sorterna SW Ares (2n), SW Bjuresele (2n), SW Nancy (4n), SW Torun (4n) och SW Yngve (2n) värmebehandlades med ThermoseedTM av Incotech AB, Uppsala och jämfördes med icke värmebehandlade frön från samma partier i växthusförsök samt i fältförsök. Partiet med SW Bjuresele var ett privat prov och de övriga erhöles från Lantmännen SW Seed genom Tore Dahlquist.

2.2.1 Isolering av patogena svampar från rödklöverutsäde och rotprover

Svamparna isolerades från 10 behandlade och 10 icke-behandlade rödklöverfrö i 1 % vatten agar (Difco) från varje sort enligt Lager & Johnsson (2002). En liten del av svampmycel inokulerades sedan i Potato Dextrose agar (Difco) och plattorna inkuberades i 20° C en vecka. Samtliga svampkulturer initierades från "single" sporer, undersökts med mikroskopi och identifierades med morfologiska karaktärer.

2.2.2 Växthusförsök

Thermoseed (TS)-behandlade och obehandlade klöverfrön av samtliga fem fröpartier såddes i plastkrukor (0,8 l) fyllda med en blandning av sand och vermiculite (50/50 volymprocent) den 20 februari 2012. Sandblandningen var gödslad med 1,5 g/L av det långtidsverkande medlet Plantacote Mix 4M (15- 4,5-12) (AgroEvo Hoechst Schering AG, Tyskland). I varje kruk såddes tio frön på ca 1 cm djup, totalt tio behandlingar med fyra upprepningar. Krukorna placerades som ett randomiserat blockförsök i växthus med temperaturen 14° C utan extra belysning. Antal uppkomna plantor räknades två gånger; 28 februari och 21 mars, och vid försökets avslut den 16 april. Då tömdes krukorna och rötterna sköljdes i kranvatten.

Skott och rötter vägdes. Yttre och inre angrepp av rottröta bestämdes enligt Rufelt (1986). Rötterna delades och graden mörkfärgning av rotens inre delar bestämdes därefter i fem klasser (0-4), och ett sjukdomsindex (SI) beräknades enligt formeln:

$$SI = \frac{\sum ((0 \times X_0) + (25 \times X_1) + (50 \times X_2) + (75 \times X_3) + (100 \times X_4))}{N}$$

Där x är antalet rötter i varje klass och N är det totala antal rötter. När rötterna graderats och prover uttagits för isolering av patogener torkades både skott och rötter för viktsbestämning.

2.2.3 Fältförsök

Thermoseedbehandlade och obehandlade klöverfrön såddes i ett fältförsök söder om Kumla den 28 maj 2012, totalt tio behandlingar med fyra upprepningar. Utsädesmängden var 8 kg/ha för diploide sorter (2n) och 10 kg/ha för tetraploida sorter (4n). Försöksrutorna var 9 m² stora och arrangerade i ett randomiserat blockförsök. Antal plantor räknades i 2 x 1 fastlagda radmeter per ruta vid två tillfällena, den 27 juni och 3 augusti.

2.3 Fälttest av sortmaterial i naturligt infekterad jord

Ett testsortiment utvaldes i samråd med förädlare vid Lantmännen SW Seed och sort företrädare vid Scandinavian Seed. Ett fältförsök anlades i Götene 29 april 2011 med följande sorter; A. SW Ares (2n) B. SW Nancy (4n) C. SW Torun (4n) D. SW Vivi (4n) E. SW Yngve (2n) F. SW Vicky (4n) G. SSD Global (2n) H. SSD Titus (4n) I. SSD Taifun (4n) J. SSD Rozeta (2n). Samman utsädesmängder användes som under 2.2.3. Prover i tre utvalda led togs vid sju tidpunkter 2011 med början 30 juni och i samliga led i juni och november. Prover för DNA-analys förvarades i frys (-18°).

3. Resultat

3.1 Diagnos av klöverrötter med utvecklad realtids PCR

Realtids PCR-metodernas specificitet har utvärderats på DNA-extrakt från ett antal olika växtpatogener. Resultatet presenteras i tabell 1.

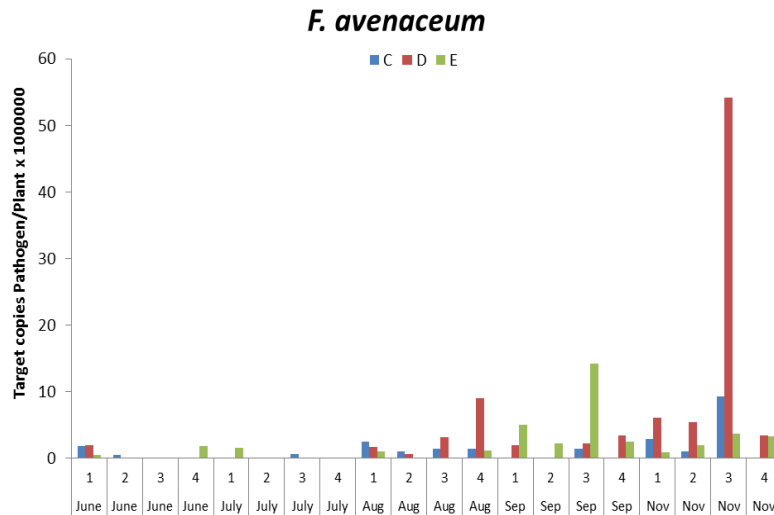
Tabell 1. Specificitetstest av *F.avenaceum*;-*F.Culmorum*-. *P.exigua* och *C.destructans* specifika test metoder på olika patogena svampar

| Art | Ursprung | Detektion <i>F. avenaceum</i> analys | Detektion <i>F. culmorum</i> analys | Detektion <i>P. exigua</i> analys | Detektion <i>C. destructans</i> analys |
|---|-----------|--|---|---|--|
| <i>Aphanomyces cochlioides</i> | Sverige | - | - | - | - |
| <i>Botrytis cinerea</i> CBS 676.89 | | - | - | - | - |
| <i>Botrytis fabae</i> CBS 108.57 | UK | - | - | - | - |
| <i>Cylindrocarpon destructans</i> var. <i>destructans</i> CBS 940.97 | | - | - | - | + |
| <i>Drechslera tritici-repentis</i> CBS 265.80 | Tyskland | - | - | - | - |
| <i>Fusarium avenaceum</i> CBS 408.86 | | + | - | - | - |
| <i>Fusarium culmorum</i> | Sverige | - | + | - | - |
| <i>Fusarium graminearum</i> | Sverige | - | - | - | - |
| <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> | Frankrike | - | - | - | - |
| <i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i> CBS 119.94 | | - | - | + | - |
| <i>Phoma medicaginis</i> var. <i>medicaginis</i> CBS 316.90 | | - | - | + | - |
| <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (apothecia) | Sverige | - | - | (+) | - |
| <i>Septoria tritici</i> CBS 292.69 | Tyskland | - | - | - | - |
| <i>Stagonospora nodorum</i> | Sverige | - | - | (+) | - |
| <i>Verticillium dahliae</i> | Sverige | - | - | - | - |

+: Detektion -: ingen detektion(+): sen detektion. Ct-värden cirka 37-38 jämfört med 19-20 för detektion av *Phoma*.

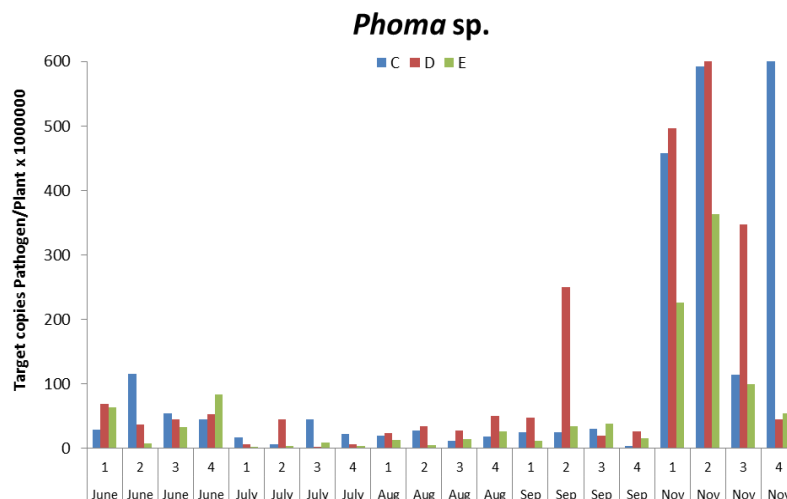
Klöverprover uttagna från sortförsöket i Götene har analyserats med qPCR. Prover uttagna i slutet av juni, juli, augusti, september samt november 2011 analyserats. *F. culmorum* kunde

endast påvisas i mycket liten mängd i ett av de 60 analyserade proven (5 tidpunkter, 4 block, 3 sorter). Nivåerna av *F. avenaceum*, *Phoma* sp och *C. destructans* redovisas i figurerna nedan för sorterna C, D och E. Vid provtagning i juni och juli kunde endast mycket små mängder *F. avenaceum* påvisas i vissa block/sorter (figur 2). Från och med augusti var detektionen mer frekvent och det enskilt högsta värdet påträffades i november (Block 3, sort D). Resultatet ger en liten indikation på att denna art kan vara patogen på rödklöver i detta sortförsök.



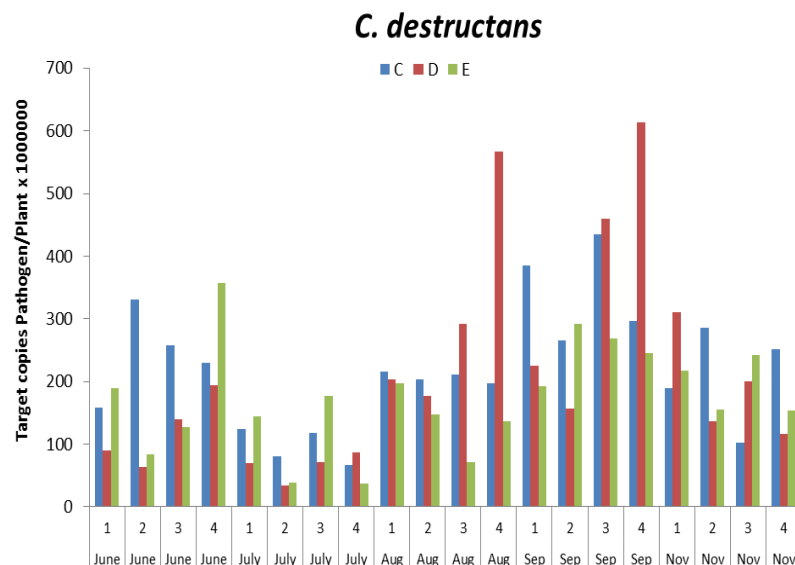
Figur 2. Antal DNA-kopior av *F. avenaceum* målsekvens per 1 000 000 kopior av referensgenen i växten. Resultat visas för provtagning under insåningsåret 2011. Tre sorter provtogs (SW Torun (C) SW Vivi, (D) och SW Yngve (E)) i fyra block (1-4).

Phoma sp. kunde påvisas i samtliga analyserade prover vid första provtagningstillfället. Nivåerna av patogenen steg kraftigt vid sista provtagningstillfället 2011 i samtliga sorter (Figur 3). Detta visar tydligt att *Phoma* sp. är patogen på rödklöver och att infektion troligtvis sker redan i början av första året då patogenen finns i jorden.



Figur 3. Antal DNA-kopior av *Phoma* sp. målsekvens per 1 000 000 kopior av referensgenen i växten. Resultat visas för provtagning under säsongen 2011. Tre sorter provtogs (SW Torun (C), SW Vivi (D) och SW Yngve (E)) i fyra block (1-4).

Även DNA från *C. destructans* kunde påvisas i samtliga analyserade prover. Det går däremot inte se någon tydlig trend i förändring av nivå över tid. Detta visar att patogenen troligtvis infekterat roten, men sedan inte tillväxer.



Figur 4. Antal DNA-kopior av *C. destructans* målsekvens per 1 000 000 kopior av referensgenen i växten. Resultat visas för provtagning under säsongen 2011. Tre sorter provtogs (SW Torun (C), SW Vivi (D) och SW Yngve(E)) i fyra block (1-4).

3.2. Isolering av svampar från rödklöverutsäde

Isolering av svampar från utsäde av de fem olika rödklöversorterna visade att Bjursele var det parti som hade störst smitta med 57 % infekterade frön i kontroll respektive 7 % i Thermoseedbehandlat frö. Morfologisk identifiering visade att *Fusarium* spp. och *Phoma* spp. endast isolerades från Bjursele. I de andra rödklöverpartierna isolerades olika svampar, som inte tillhör rotrötekomplexet.

3.3. Krukförsök

3.3.1. Uppkomst

Uppkomsten av totalt 10 sådda frön visas i tabell 2. Uppkomsten var signifikant högre för samtliga sorter jämfört med SW Bjursele vid båda planträkningarna, förutom SW Nancy som inte skiljde sig från någon annan sort. Det fanns ingen statistiskt signifikant skillnad i uppkomst mellan de två fröbehandlingarna eller i interaktionen mellan sort och fröbehandling.

Tabell 2. Antal uppkomna plantor per kruka vid två tidpunkter i rödklöversorter med och utan Thermoseedbehandling

| Huvudeffekt | Plantor/kruka | |
|--------------------------|-------------------|-------------------|
| | 28 feb | 21 mars |
| Sort | | |
| SW Ares | 8,8 ^{a1} | 8,9 ^a |
| SW Torun | 8,6 ^a | 8,8 ^a |
| SW Yngve | 8,9 ^a | 8,9 ^a |
| SW Nancy | 8,0 ^{ab} | 8,3 ^{ab} |
| SWBjursele | 6,8 ^b | 6,9 ^b |
| <i>p</i> (sort) | 0,002 | 0,003 |
| Fröbehandling | | |
| Kontroll | 8,1 | 8,3 |
| Thermoseed | 8,3 | 8,4 |
| <i>p</i> (fröbehandling) | <i>es</i> | <i>es</i> |
| <i>CV</i> | 12,6 | 12,7 |

¹Olika bokstäver indikerar signifikanta skillnader mellan behandlingarna inom varje huvudeffekt

3. 3.2 Sjukdomsindex

Graderingen av rotträta i rötterna visar att Bjursele hade högst sjukdomsindex i kontrolleret jämfört med de andra fyra sorterna. Resultatet är samstämmigt med resultatet från undersökningen av frösmitta på agarplattor. Däremot visar Ares och Nancy lägst sjukdomsindex i kontrollbehandlingen. TS-behandling har minskat infektionen med 25 % i Bjursele, men infektionen har ökat med 166, 133 och 28 % i Ares, Nancy och Yngve. Infektionen var på samma nivå i kontroll- och TS-behandling i Torun (tabell 3).

Tabell 3. Medeltal av sjukdomsindex i krukförsök efter två månader

| Huvudeffekt | SI |
|---------------------------|-----------|
| Sort | |
| SW Ares | 3,2 |
| SW Torun | 4,3 |
| SW Yngve | 5,3 |
| SW Nancy | 2,9 |
| Bjursele | 6,2 |
| <i>p (sort)</i> | <i>es</i> |
| Fröbehandling | |
| Kontroll | 4,1 |
| Thermoseed | 4,4 |
| <i>p (fröbehandling)</i> | <i>es</i> |
| <i>p (sort x fröbeh.)</i> | <i>es</i> |
| CV | 65 |

3.4. Fältförsök

Signifikanta skillnader i uppkomst både mellan både sorter och fröbehandlingar (tabell 4) fanns vid avläsningen 27 juni. TS-behandlade frön hade lägre fältuppkomst jämfört med kontrollerna. Dessa skillnader försvann senare och i augusti fanns inga signifikanta skillnader vare sig mellan sorter eller mellan behandlingar, även om det fortfarande fanns en stark tendens ($p = 0,01$) att uppkomsten var lägre för TS-behandlade frön (tabell 4).

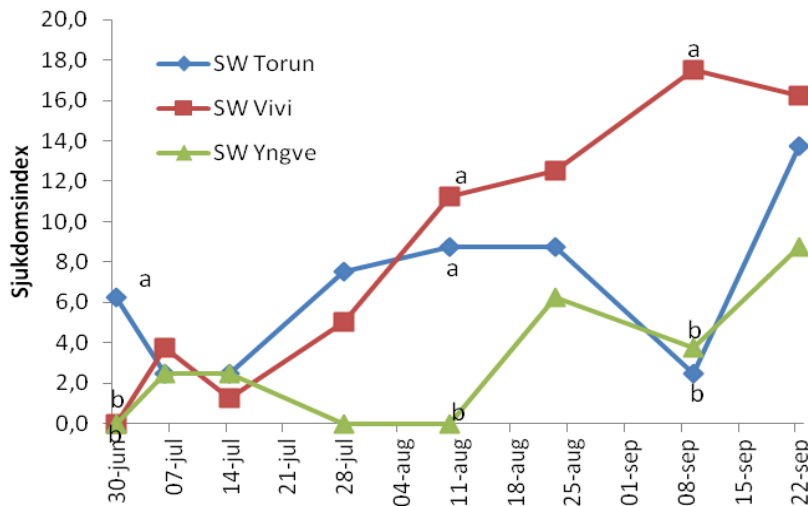
Tabell 4. Antal uppkomna plantor per m² i fältförsök

| Huvudeffekt | Plantor/radmeter | |
|--------------------------|------------------|------------------|
| | 27 juni | 3 augusti |
| Sort | | |
| SW Ares | 89 ^a | 78 |
| SW Torun | 58 ^b | 57 |
| SW Yngve | 57 ^b | 61 |
| SW Nancy | 64 ^{ab} | 66 |
| SW Bjursele | 86 ^a | 73 |
| <i>p (sort)</i> | 0,024 | <i>es</i> |
| Fröbehandling | | |
| Kontroll | 78 ^a | 71 |
| Thermoseed | 62 ^b | 62 |
| <i>p (fröbehandling)</i> | 0,05 | <i>es (0,01)</i> |
| CV | 15,6 | 12,3 |

^aOlika bokstäver indikerar signifikanta skillnader mellan behandlingarna inom varje huvudeffekt

3.4 Fälttest av sortmaterial i naturligt infekterad jord

Bestämningen av rottröta visar svaga och signifikant skilda angrepp mellan sorter redan vid första provtagningstillfället (Figur 5). Angreppen i SW Vivi ökar snabbast men vid sista avläsningen finns inga signifikanta skillnader mellan sorterna.



Figur 5. Inre sjukdomsindex i tre utvalda sorter, SW Torun, SW Vivi och SW Yngve. Signifikanta skillnader mellan sorterna vid varje tidpunkt markerade med olika bokstäver.

Diskussion

Svampar främst ur släktet *Fusarium* där *F. avenaceum* och stammar av *F. culmorum* anses vara den främsta orsaken till rottröta i rödklöver tillsammans med *Cylindrocarpon destructans*, *Phoma exigua* (Rufelt, 1986). Svaga angreppen är synliga och utbredda i odlingarna redan insåningsåret (Wallenhammar *et al.*, 2005). Vi har utvecklat real-tids PCR-metoder och fastställt när i tid de olika patogenerna i rottrötekomplexet infekterar roten. Våra avläsningar av sjukdomsindex visade förekomst av angrepp vid första provtagningstidpunkten (fig 5) och inga signifikanta skillnader kunde visas mellan sorter i september. DNA-analyserna visade att *C. destructans* förekommer redan vid första provtagningen (fig 4). *Phoma* spp. (primrarna detekterar både *P. medicaginis* och *P. exigua*) förekommer i låga nivåer från första provtagningen (fig 3) och ökade till betydligt högre nivåer under hösten. *F. avenaceum* däremot detekterades sporadiskt under sommaren och ökar något under hösten. *F. culmorum* detekterades endast mycket sporadiskt. Resultaten är i linje med den första analysen med kvalitativa molekylära metoder av mykofloran som associeras med mörkfärgning i roten. När Wessén (2006) visade att *C. destructans*, *P. exigua*, *F. avenaceum* och *Ascomycota* sp. förekom i högst frekvens. Vi påvisade *Phoma* spp. i samtliga analyserade prover vid första provtagningstillfället den 30 juni. Nivåerna av patogenen steg kraftigt i slutet av säsongen i samtliga sorter (fig 3) vilket tydligt visar att *Phoma* sp. är viktig patogen på rödklöver och att infektion troligtvis sker redan i början av första året då svampen finns i jorden. Patogener har olika infektionsmekanismer, och angriper olika delar av roten. Mekanismerna kan skilja mellan hur olika patogener invaderar rötterna och orsakar skada (Tewoldermedhin *et al.* 2011b). Några isolat kan ha en större potential att orsaka celledöd genom till exempel produktion av enzymer som bryter ner cellväggarna och därigenom underlättar för andra patogener att ta sig in. Utvecklingen av samtliga patogener följs med analyser i vall I och vall II.

Thermoseedbehandling kan effektivt sanera utsädesmatta då antalet infekterade frön minskade från 57 % till 7 %, vilket överensstämmer med Lager och Johnsson (2002). Våra resultat visar dock inte någon skillnad i uppkomsten i Thermoseedbehandlade led i

växthusförsöket. Däremot hade Thermoseedbehandlade frön en statistiskt lägre uppkomst i fältförsöket. Rödklöver är känslig för låga jordtemperaturer och kan vara en bidragande orsak. Vid andra avläsningen hade skillnaden utjämnats men det fanns en stark tendens till lägre uppkomst för Thermoseedbehandlade frön.

De molekylära metoder som utvecklats ger oss möjlighet att karaktärisera jordens mykoflora och behovet förstärks av att de mest patogena Fusariumsvamparna, *F. culmorum* och *F. avenaceum*, har en stor krets av värdväxter och kan angripa och uppföras i flera olika baljväxtarter, vallgräs och vete (Lager och Gerhardson, 2002, Chang et al, 2004.)

Presentation av innehållet i redovisningen

Projektet beviljades som ettårigt projekt 2009 benämnt H0960323. Projektet startade senhösten 2010, och vakanser har medfört att flera delar av projektet utförts under 2011-2013. Arbetet med värmebehandling av rödklöverutsäde inleddes i september 2011. Därefter isolerades patogener från utsäde i agarplattor. Samma utsädespartier odlades i växthus (2012) samt i fält (2012). Utveckling av DNA-analyser gjordes i huvudsak 2011, och fullföljdes 2013 då också rötterna från fältförsöket analyserades.

Slutsatser

Rödklövers korta varaktighet är ett stort problem i vallodlingen och ger snabbt förändrad sammansättning så att de insådda gräsen dominerar. De molekylärbiologiska metoder som vi utvecklat ger oss möjlighet att utreda effekter av odlingsåtgärder och att identifiera tillvägagångssätt för att stärka uthålligheten i rödklöver. Thermoseedbehandling kan vara en möjlig metod för att sanera infekterat utsäde.

Tack

Tack riktas till Tore Dahlquist Lantmännen SW Seed för leverans av särskilt utvalda utsädespartier, till Linda Öhlund, Lantmännen SW Seed och Johan Klingspor, Scandinavian Seed för tillgång till fröer av testsortiment.

Resultatförmedling

Farmers University, Kulturcentret, Järna. 30 deltagare, lantbrukare och rådgivare, 6 augusti 2013.

Planerad förmedling; Uddevalla möte januari 2014, Vallkonferens februari 2014.

Referenser

- Chan, M. K.Y., & Close, R. C. 1987. Aphanomyces root rot of peas 2. Some pasture legume and weeds as alternative hosts for *Aphanomyces eutheiches*. New Zealand Journal of Agricultural Research 30, 219-223.
- Forsberg, G. 2004. Control of Cereal Seed-borne Diseases by Hot Humid Air Seed Treatment. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Agraria 443.
- Frankow-Lindberg, B. 1989. The effect of nitrogen and clover proportion on yield of red clover-grass mixtures. XVI International Grassland Congress, Nice. 173-174.
- Gaue, R. & Ingversen, B. 2003. Methods and Results of Red Clover Breeding at the Norddeutsche Pflanzenschutz Hans-georg Lembke KG. J Genet Plant Breeding, 39, 86-90.
- Lager, J. & Gerhardson, B. 2002. Pathogenicity of clover root pathogens to pea, bean and Lucerne. Zeitschrift für Pflanzkrankheiten und Pflanzenschutz 109, 142-151.
- Lager, J & Johnsson, L. 2002. Seed-borne fungi affect field emergence in red clover. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 109 (4), 350-356.

- Nicolaisen, M. & Suproniene, S. 2009. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbial Methods*. (76:3) 234-240.
- Nykänen, A., Granstedt, A., Laine, A. & Kunttu, S. 2000. Yields and clover contents of leys of different ages in organic farming in Finland. *Biological agriculture & horticulture* 18 (51), 5–66.
- 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.T., Mazzola, M., Mostert, L & McLeod, A. 2011*a*. *Cylindrocarpon* species associated with apple tree roots in South Africa and their quantification using real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology* 129, 637-651.
- Tewoldemedhin, Y.T., Mazzola, M., Labuschagne, I. & McLeod. 2011*b*. A multi-phasic approach reveals that apple replant disease is caused by multiple biological agents, with some agents acting synergistically. *Soil Biology & Chemistry*. 43, 1917-1927.
- Waalwijk, C., & van der Heide, R. Quantitative detection of *Fusarium* species in wheat using Taqman. *European Journal of Plant Pathology*, (110) 481-494.
- Wallenhammar, A.-C. & Anderson, L.E. 2002. Kvalitetsodling av vårvete efter klöverrik vall. I: Jordbrukskonferensen 19–20 november. SLU. Uppsala. 162.
- 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. & L. Bäckström, G-. 2008. Influence of root rot on the sustainability of grass/legume leys in Sweden. 22nd meeting of the European Grassland Federation, Uppsala, June 9-12th, 2008. *Grassland Science in Europe* 13.
- Wessén, G. 2006. Root rot in red clover (*Trifolium pratense* L.). MSc thesis, 20 credits, D-level. Sveriges Lantbruksuniversitet. Inst för skoglig mykologi och patologi.