

## Slutrapport H0760013

### Utredning av skillnader i svampflora i vete och kornprover med olika ergosterolnehåll predikterat med NIT

#### Bakgrund

Sedan 1998 har data samlats in för uppbyggnad av en kalibrering med vilken svampförekomst i spannmål kan detekteras med hjälp av Nära Infraröd Transmittans (NIT). Analysen medför inget merarbete eftersom värdet erhålles samtidigt som andra parametrar mätes med NIT-utrustningen vid mottagning av spannmål. Metoden bygger på kalibrering mot etablerad vätskekromatografisk metod för bestämning av ergosterol som är en svampspecifik sterol (NMKL, 2002). Sambandet är tydligt, men tycks inte nå motsvarande precision som mer etablerade kalibreringarna som t.ex. vatten och protein. Metoden har visat på samband med mögelförekomst uppmätt med andra metoder och en viss korrelation mot olika mykotoxiner har också konstaterats. Framförallt har sambandet mellan prediktion av ergosterol med NIT (NIT-Ergo) och förekomsten av Fusariumtoxiner deoxynivalenol (DON) och zearalenon (ZEA) studerats. Prover med höga NIT-Ergo värden ger ofta höga halter ZEA och det finns också ett tydligt samband mellan NIT-Ergo och DON, om än inte lika starkt som för ZEA. Risken för höga ZEA och DON halter ökar markant för vete med högre halt NIT-Ergo än ca. 20 mg/kg. För korn är underlaget inte lika stort, men den kritiska gränsen tycks även här ligga kring 20 mg/kg eller möjligen något högre. Vår erfarenhet är vidare att halten generellt stiger under skördeperioden, möjligen kopplat till nederbörd, men detta har inte studerats systematiskt.

Efter att ha kört ett antal prover från fältförsök, kunde man konstatera dels att sortskillnader kan vara ganska betydande medan olika svampbekämpningsstrategier inte verkar ge några större skillnader i NIT-Ergo värden. Det vore av stort värde om metoden skulle kunna användas t.ex. som en första screening för att sortera bort förädlingsmaterial med hög känslighet för svampinfektion. Eftersom metoden är indirekt finns det risk för artefakter, d.v.s. att värdet påverkas av andra faktorer än skillnader i svampförekomst. Detta kan enklast studeras genom att systematiskt jämföra NIT-Ergo med referensanalyser körda med vätskekromatografi (REF-Ergo). Ergosterol har i sin tur visat sig vara en bra indikator på svampbiomassa (Matcham m.fl., 1985). Syftet med här redovisat projekt var därför att närmare studera dessa samband med hjälp av vete och korn från olika typer av försök. Metoden har sedan några år tillbaka börjat användas på allt vete och korn som kommer in till AgriLab i Uppsala och HS lab i Skara så det finns ett stort urval av försök att välja ut prover från för dessa studier. Vad vi även velat närmare studera är om olika svampsläkten påverkar avläsningarna mer än andra. Eftersom det finns samband mellan NIT-Ergo värden och halten Fusariumtoxiner, är det rimligt att anta att det även finns samband mellan infektionsgrad av Fusarium och Ergo. Förutom att utnyttja försök som lagts ut för andra ändamål, lades även skördetidsförsök ut för att systematiskt studera hur en fördröjd skörd påverkar halten ergosterolhalterna.

#### Målsättning

- Avgöra om uppmätta skillnader i Ergo predikterade med NIT beroende på sort, skördetid, gödsling och ogräsbekämpning motsvaras av verkliga skillnader i svampbiomassa.
- Utredda om olika mögelsläkten påverkar prediktionen av NIT-Ergo i olika hög grad.
- Systematiskt undersöka effekten av skördetid på REF-Ergo, NIT-Ergo och svampförekomsten.

## **Material och metoder**

Totalt gjordes analyser av 135 prover, något färre än plan p.g.a. stora problem med skörden 2008 som gjorde att skördetidsprojektet inte kunde genomföras som planerats (se nedan). Samtliga prover analyserades med NIT-Ergo och REF-Ergo. På ett urval om 87 prover gjordes dessutom mikrobiologiska analyser enligt nedan. Samtliga analyser utfördes av Eurofins, Sverige.

### Spannmålsprover från befintliga försök

När det gäller befintliga försök i vete togs prover ut från 5 sortförsök ur serien L7-101, svampbehandlade led. Från varje försök togs 2007 4 sorter ut: Oakley, Skalmeye, Akteur och Tulsa. Att just dessa sorter valdes ut, berodde dels på att de är relevanta för svensk växtodling och kunde tänkas få betydelse i framtiden. Samtidigt representerade de olika ergosterolnivåer, där Oakley uppvisade höga nivåer, medan Akteur hade låga nivåer med de båda andra däremellan. Dessutom valdes två gödslingsförsök ut liksom två ogräsförsök. Anledningen var att man även här hade tydliga skillnader mellan de olika leden i NIT-Ergovärden.

Följande år, 2008, togs samma sorter som 2007 ut, och dessutom sorten Hereford, som t.o.m. hade lite högre värden än Oakley detta år. Två gödslingsförsök valde ut även detta år och dessutom sex stycken vårveteprover. Anledningen till att komplettera med vårvete var framförallt att halterna av DON och ZEA var mycket höga i vårvete detta år och det kunde vara intressant att studera eventuellt samband mellan dessa toxiner, REF-Ergo och förekomsten av *Fusarium*. NIT-Ergo har tidigare inte visat något tydligt samband mot dessa toxiner just i vårvete. Så dessa försök skulle kunna ge ytterligare upplysningar om dessa förhållanden.

När det gäller korn valdes samma antal prover ut båda åren, 3 sorter ur serien L7-401 från 6 platser. Båda åren valdes Tipple och Sebastian där Tipple genomgående uppvisade lägre ergosterolhalter än genomsnittet, medan Sebastian låg över genomsnittet. Undantaget var ett försök 2007 där Sebastian saknades och ersattes av Gustaf. Som sort med medelhöga halter valdes 2007 Pasadena och 2008 Henley.

### Spannmålsprover från skördetidsförsök

För att specifikt studera tidsfaktorn planerades att skörda vete och korn vid tre tillfällen på 3 olika platser 2008, Helgegården, Kristianstad, Logården, Grästorp och Brunnby, Västerås. På grund av ovanligt besvärliga skördeförhållanden blev bara en bråkdel av planerade skördar genomförda på Logården och Brunnby. Istället beslöts att upprepa försöket på Helgegården 2009. Här skördades både vete och korn 1/8, 8/8 och 30/8 2008 och 5/8, 12/8 och 25/8 2009. De använda sorterna var 2008 Tulsa respektive Prestige och 2009 Tulsa respektive Gustav. Då nederbörden före skörd och vid skörd har stor betydelse för ergosterol och *Fusarium*belastningen registrerades nederbörden på försöksplatsen under juli och augusti: 2008 var nederbörden i juli 52 mm och i augusti 125 mm. Siffrorna för 2009 var 125 mm i juli och 40 mm i augusti.

En hypotes är att svampbiomassan skulle kunna vara större på färsk spannmål än då den avmognat helt och blivit torrare och att detta skulle kunna avspeglas i ergosterolavläsningarna. Detta studerades i skördetidsprojektet 2009 genom att ergosterolmätningar gjordes på både otorkad och torr spannmål.

### Mikrobiologiska analyser

Endogen infektion och utlägg av icke ytsteriliserade kärnor på DG 18-agar (Hoking och Pitt, 1980): uppdelning på släktena *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* *Alternaria* och *Cladosporium*. Dessutom gjordes utlägg av ytsteriliserade kärnor på CZID-agar, som rekommenderas som

selektivt medium för *Fusarium* (Thrane, 1996) för att få en extra kontroll av förekomst av *Fusarium*.

### Kemiska analyser

Våtkemisk ergosterol analyserades med metoden NMKL 172. Denna bygger på extraktion med etanol, vätskekromatografisk separation och detektion med UV-detektor. NIT-Ergo bestäms genom upptag av 10 NIT spektrum/prov. Spektra omsätts sedan till mätvärden genom matchning mot databas som innehåller hundratals spektra där REF-Ergo är känt.

### Statistik

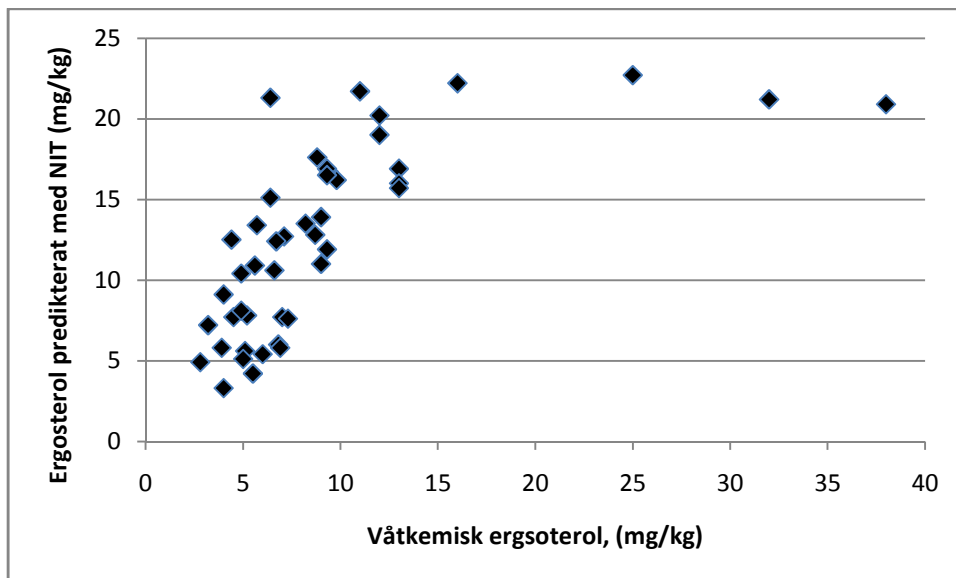
Statistiska samband studerades med hjälp av statistikfunktionen i Microsoft Office Excel 2007.

## **Resultat**

### Befintliga försök

Skördesäsongen 2008 var betydligt blötare och besvärligare än 2007, vilket avspeglar sig i att de genomsnittliga värdena i höstvetete för både NIT-Ergo och REF-Ergo var betydligt högre i sortförsöken 2008 än 2007. Medelvärdet för NIT-Ergo var 12,2 2007 mot 14,5 2008, medan REF-Ergo ökade från 7,7 2007 till 11,6 mg/kg ts 2008. Andelen ytsteriliserade kärnor infekterade med *Fusarium* var 4 % 2007 och 11,5 % 2008 (CZID-agar,). DG18 utlägggen av osteriliserade kärnor visade också på lite högre infektionsgrad för *Fusarium* och *Alternaria* 2008 än 2007.

Sambandet mellan NIT-ergosterol och referensergosterol beskriver en korrelation på 0,67. Regressionsanalys och parat t-test visar att systematiska skillnader mellan metoderna inte kan uteslutas ( $p=0,05$ ). Ett tydligt tak då NIT-Ergo inte längre ökar med ökad REF-Ergo kan iakttas. (Figur 1)



Figur 1. Våtkemisk ergosterol jämfört med NIT-ergosterol i höstveteprover från sortförsök.

Bortser man från de tre högsta REF-Ergo värdena erhålls en korrelationskoefficient på 0,81 och

det linjära sambandet ser mycket bättre ut. I båda fallen var sambandet signifikant. Studierna av samband mellan ergosterol och svampinfektion i sortförsöken visade att främst *Fusarium* påverkar halten ergosterol. Korrelationskoefficienten var högst mellan NIT-Ergo och *Fusarium* på CZID-agar (0,51). Näst högst var den mellan NIT-Ergo och *Fusarium* på DG 18 (0,33) och i båda dessa fall var sambanden signifikanta. Övriga korrelationskoefficienter var mycket låga och inte signifikanta. Våtkemisk ergosterol korrelerade något bättre mot *Fusarium* (CZID 0,76, DG 18 0,39) än NIT-prediktionerna. Det fanns skillnader mellan sorterna även om detta var ganska otydligt 2008 (Tabell 1). Värt att notera är att sortordningen för REF-Ergo är densamma 2007 och 2008. I stigande halt var ordningen Akteur, Skalmeye, Tulsa och Oakley.

Tabell 1. Medelvärden för ergosterol (mg/kg), predikterat med NIT och uppmätt med referensmetod och andel infekterade vetekärnor vid utlägg på CZID- och DG 18 agar i procent (N = 5 eller 6).

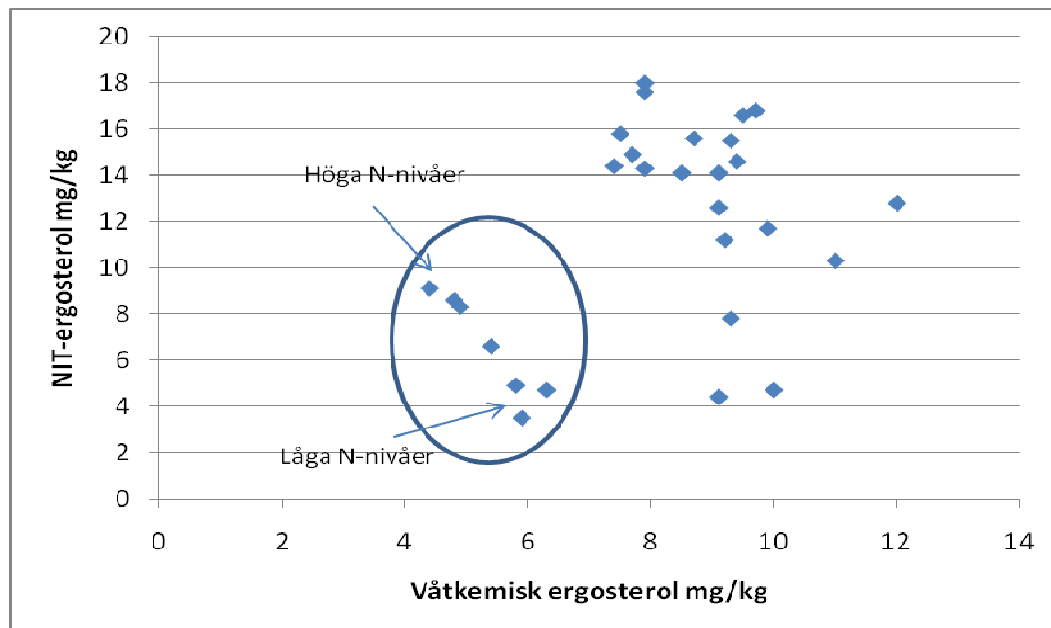
År	Sort	NIT-Ergo	REF-Ergo	Fusariuminfektion %	
				CZID	DG 18
2007	Akteur	10	6	3	3
2007	Oakley	14	10	6	2
2007	Skalmeye	12	7	3	2
2007	Tulsa	13	7	4	2
2008	Akteur	12	6	3	6
2008	Hereford	13	12	17	10
2008	Oakley	13	13	8	4
2008	Skalmeye	13	9	14	4
2008	Tulsa	14	11	9	9

Ogräsförsöken visar en korrelationskoefficient på 0,98 mellan NIT-ergosterol och referensergosterol. Systematiska skillnader mellan metoderna går inte att utesluta för dessa data ( $p=0,05$ , Tabell 2) även om skillnaderna var mycket små. I dessa försök var efter en normal rensning halterna NIT-Ergo betydligt högre i obehandlat led, men efter extra noggrann rensning då snärjmårefrön rensats bort, var skillnaderna mellan leden små.

Tabell 2. NIT-Ergo och REF-Ergo i extra välrensade prover från ogräsförsök 2007.

Län	ADB	Behandling	Sort	NIT-Ergo	REF-Ergo
R	F35146	Obeh	Olivin	14,7	14
R	F35146	Obeh	Olivin	14	12
R	F35146	Beh	Olivin	12,3	12
R	F35146	Beh	Olivin	12,3	12
E	HC0541	Obeh	Mulan	9,2	7,9
E	HC0541	Obeh	Mulan	9,5	8
E	HC0541	Beh	Mulan	8,7	7,2
E	HC0541	Beh	Mulan	8,6	6,9

Däremot visade det sig att kvävegödning kan ge höjningar av NIT-Ergo som inte motsvaras av en parallell höjning av REF-Ergo (Figur 2).



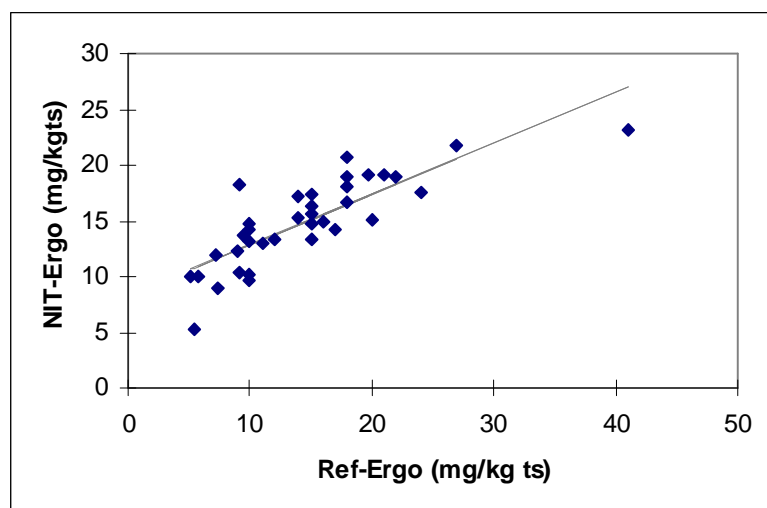
Figur 2. NIT respektive våtkemisk ergosterol i två gödslingsförsök 2007 och två 2008. Kvävegödslingsnivåerna varierade mellan 0 och 240 kg N/ha. Inringade punkter är alla från samma försök (03h099 utlagt i Västmanland 2007).

När det gäller vårvete var sambandet NIT-Ergo och REF-Ergo svagt (Tabell 3). Både REF-Ergo värden och andelen kärnor endogent infekterade med *Fusarium* var mycket högt. Även mykotoxinnivåerna var höga i dessa prover, så för vårvete ger NIT-Ergo värdena inte en tillfredsställande bedömning av mögelstatus.

Tabell 3. Ergosterol och mikrobiologiska analyser av vårveteprover 2008.

Län	ADB	Sort	NIT-Ergo	REF-Ergo	Andel infekterade kärnor (%)					
					CZID		DG 18			
					<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Cladosporium</i>
T	07BD40	Vinjett	11	21	30	32	58	6	10	40
T	07BD40	Triso	11	17	50	44	64	2	34	36
C	07BD55	Vinjett	13	23	30	0	48	4	32	18
C	07BD55	Triso	12	19	30	0	42	12	14	34
U	07BD56	Vinjett	17	16	60	2	38	10	8	22
U	07BD56	Triso	13	17	25	0	32	4	14	32

Även för korn var både NIT-Ergo och REF-Ergo högre 2008 än 2007. Medelvärdet för NIT-Ergo var 14,4 mg/kg 2007 mot 15,4 mg/kg 2008, medan REF-Ergo ökade från 12,2 2007 till 16,8 2008. Andelen ytsteriliserade kärnor infekterade med *Fusarium* ökade från 19 % 2007 till 30 % 2008 (CZID-agar,). DG18 utläggen av osteriliserade kärnor visade på lite högre infektionsgrad för *Cladosporium* och *Alternaria* 2008 än 2007, men däremot inte för *Fusarium*. Även när det gäller korn följdes halterna NIT-Ergo och REF-Ergo åt i sortförsöken. Korrelationskoefficienten mellan NIT-Ergo och REF-Ergo var här 0,82 (Figur 3) och signifikant.



Figur 3. Våtkemisk ergosterol jämfört med NIT-ergosterol i kornprover från sortförsök

För dessa försök visar parat t-test 0,61 (>0,05) vilket visar att det inte finns några systematiska skillnader mellan metoderna ( $p=0,05$ ). Korrelationskoefficienterna mellan NIT-Ergo och *Fusarium* på CZID agar var 0,68 och *Fusarium* på DG 18 0,29. Det förra sambandet var signifikant, men inte det senare. Korrelationerna mot andra svamparter var även här mycket låga, ofta negativa och inte signifikanta. Skillnaderna mellan sorterna var något tydligare än för vete och samma rangordning av sorterna kunde iakttagas båda åren (Tabell 3).

Tabell 3. Medelvärden för ergosterol (mg/kg), predikterat med NIT och uppmätt med referensmetod och andel infekterade kornkärnor vid utlägg på CZID- och DG 18 agar i procent (N = 5 eller 6).

År	Sort	NIT-Ergo	REF-Ergo	Fusariuminfektion %	
				CZID	DG 18
2007	Pasadena	16	12	17	7
2007	Sebastian	17	15	26	8
2007	Tipple	12	11	18	6
2008	Henley	14	13	22	0
2008	Sebastian	18	21	39	0
2008	Tipple	14	16	29	0

I både höstvetete och korn var det en tydlig regional skillnad i förekomsten av *Alternaria*. I höstvetete låg nivån på över 50% infektionsgrad i de båda skånska försöken, medan infektionsgraden var under 20% i övriga försök. I korn varierade *Alternaria*-förekomsten mycket mellan olika försök, med mycket hög andel infekterade kärnor i Kristianstads län (89%). Hög *Alternaria*-infektion var inte kopplat till höga ergosterolnivåer.

#### Skördetidsförsök

Resultaten skilde sig åt mycket kraftigt mellan åren. Första året, 2008, var halterna ergosterol ganska låga vid första skördetillfället, men steg kraftigt från första till sista skördetillfället. Detta gällde både för vete och korn och NIT-Ergo och REF-Ergo. Omvända förhållandet rådde 2009. Då var halterna höga vid första skördetillfället, men låg därefter ganska konstant (Tabell 4).

Tabell 4. Ergosterolvärden predikterade med NIT och uppmätt med våtkemisk metod från skördetidsförsöket utlagt i Kristianstad.

Skördetid	2008				2009			
	Vårkorn		Höstvetete		Vårkorn		Höstvetete	
	NIT-Ergo	REF-Ergo	NIT-Ergo	REF-Ergo	NIT-Ergo	REF-Ergo	NIT-Ergo	REF-Ergo
tidig	9	5	6	6	21	18	13	10
normal	12	7	12	7	21	20	12	11
sen	20	16	15	12	20	19	11	8

Mikrobiologiska analyser utfördes på proverna som togs ut 2008. Sambandet var här ganska svagt mellan ergosterol och Fusariumförekomst. Fusariumförekomsten steg inte på samma sätt som ergosterolvärden mellan första och sista skördetillfället.

Ingen effekt av torkning noterades varken på NIT-Ergo eller REF-Ergo värdena, trots att det var ganska stor skillnad i vattenhalt mellan otorkade och torkade prover.

## Diskussion

Undersökningen visar tydligt att de sortskillnader både i höstvetete och korn som noteras med hjälp av NIT-Ergo motsvaras av liknande skillnader även när det gäller REF-Ergo. Däremot måste NIT-Ergo värdena bättre anpassas till REF-Ergo värden i vårvete. Ett arbete som påbörjats inom samarbetsprojektet ErgoNET. Det finns också en koppling till sorternas känslighet för Fusariuminfektion mätt som andelen kärnor infekterade med Fusarium. Framförallt gäller detta vid utlägg av ytsteriliserade kärnor på CZID-agar. Att man inte får lika tydligt samband mot Fusariumutväxt på osterila kärnor kan ha att göra med att man här får med konkurrensförmågan för respektive släkte jämfört med andra. Som exempel på en sort som utmärker sig både när det gäller NIT-Ergo och Fusariumkänslighet kan nämnas Oakley som hade högre NIT-Ergo värden än genomsnittet och även visat sig tillhöra de sorter som är mest känsliga för Fusariuminfektion (Lise Nistrup-Jørgensen, pers. komm.). Detta har även visats i pågående projekt där olika sorters Fusariumkänslighet testas. Man kan även notera att den kornsort som hade den högsta halten ergosterol (Sebastian) även visat sig uppvisa problem med sprickbildning (CG Pettersson, pers. komm.) vilket kan vara en inkörsport för Fusariuminfektion. Att man framförallt mäter graden av Fusariuminfektion med NIT-Ergometoden visas även av att man inte finner något samband mellan infektionsgrad för andra svampar och ergosterol. Att prover med högre inblandning av ogräsfrön gav högre värden både för NIT-Ergo och REF-Ergo kan troligen då förklaras av att ogräsfrön har större yta i relation till volym än spannmålskärnor och därmed mer utsatta för svampinfektion än spannmålskärnor. Däremot verkar de som om de förhöjda proteinhalten som man uppnår i gödslingsförsök kan ge artefakter. I dessa fall var dock mycket stora skillnader i proteinhalt mellan de olika leden i försöken. Exempelvis varierade proteinhalten mellan 8,4 och 12,9 % mellan lägsta och högsta N-givan (0-240 kg N/ha) i försöket 03h099. Detta tyder på visst överlapp mellan de våglängder som utnyttjas för prediktion av protein och ergosterol och ev. kan man genom att lägga in flera prover från sortförsök som inte skiljer sig på annat sätt än proteinhalten påverka ergosterol-prediktionerna positivt. Däremot verkar inte detta fenomen varas så påtagligt när det gäller vattenhaltsskillnader. Projektet har också tydligt visat på effekterna av fördröjd skörd. Här var ergosterolhalten mer följsamma jämfört med mätningarna av Fusariuminfektion. Intressant att notera var också att en våt period före skörd resulterade i högre ergosterolvärden vid skörd i början av augusti än en torr juli-månad.

## Slutsatser

- Sortskillnader som registreras med NIT-Ergo metoden motsvaras av liknande skillnader i svampbiomassa uppmäts med referensmetoden REF-Ergo
- Detsamma tycks gälla för skillnader som uppträder vid olika mycket ogräsinblandning
- Däremot kan kvävegödsling ge höjda värden på NIT-Ergo värden som inte motsvaras av höjningar av REF-Ergo värden
- NIT-Ergo verkar vara kopplat till infektion av *Fusarium*. I mindre grad, eller inte alls till andra förekommande svamparter
- Fördröjd skörd ger tydlig effekt både på NIT-Ergo och REF-Ergo och detta kan vara kopplat till nederbördsmängden.
- NIT-Ergo avläsningen är inte känslig för skillnader i vattenhalter.
- I vårvete måste NIT-Ergo metoden anpassas bättre mot REF-Ergovärden för att kunna användas för riskvärdering.



### **Resultatförmedling till näringen**

Resultaten har rapporterats vid Växtskyddskonferensen i Växjö 2009. Ett föredrag med titeln "Ergosterol – indirekt bestämning av svampförekomst. Kan halterna påverkas av odlingsåtgärder?" presenterades där.

### **Referenser**

Hocking, A.D., and Pitt, J.I. 1980. Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low moisture foods. *Appl. Environm. Microbiol.* 39:488-492.

Matcham, S.E., Jordan, B.R. & Wood, D.A. 1985. Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21:108-112.

NMKL. 2002. Ergosterol – Väcksekromatografisk bestämning i spannmål. 172.

Thrane, U. 1996. Comparison of three selective media for detecting *Fusarium* species in foods: a collaborative study. *Int. J. Food Microbiol.* 29:149-156.

### **Personlig kommunikation**

Lise Nistrup-Jørgensen, Pesticidforskning og Miljøkemi, Institut for Plantebeskyttelse og Skadedyr, Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet, Danmark.

CG Pettersson, Marknad/Affärsutveckling, Lantmännen Lantbruk.