

Metodutveckling för ökad precision vid riskbedömning av bomullsmögel i oljeväxter

Bakgrund

Oljeväxtodlingen har ökat kraftigt de senaste åren och var 2006 strax under 100 000 ha (SCB, 2007). Odlingen har efter en svacka under slutet av 1990-talet återhämtat sig och är nu den största sedan tiden före EU-inträdet. Det finns förhoppningar om en areal närmare 200 000 ha, vilket är mer än vad som anses vara maximalt för landets odlingsareal. En större odlad areal medför risk för ökande angrepp av svampsjukdomar som bomullsmögel (*Sclerotinia sclerotiorum*), klumprotsjuka (*Plasmodiophora brassicae*) och kranmögel (*Verticillium longisporum*), vilka överlever i marken med vilkroppar respektive vilsporer.

Bomullsmögel orsakar stora skador framförallt i vårraps vissa år när nederbörden varit gynnsam för svampens utveckling. Resistens saknas och en fungicidbehandling måste göras förebyggande. I dag finns ett ökat utbud av fungicider som i kombination med en mer intensiv odling kan leda till en ökad frekvens av svampbehandling. En förebyggande behandling kräver att odlaren gör en bedömning av risken för angrepp. Det verktyg som finns att tillgå är den "riskvärdering" som utarbetats vid SLU (Anonym, 2008), där nederbörd och lokala observationer från sklerotiedepåer ger en regional vägledning. 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. Detta smittotryck på fältnivå kan bestämmas genom analys av kronbladen, och ett agartest utvecklades i Kanada av Morall *et al.* (1991). Agartestet användes i en studie i Mellansverige (Wallenhammar och Sjöberg, 2000) där samstämmigheten mellan låg sporförekomst och låg infektionsgrad var god. Agartestet tar 5-6 dagar innan en avläsning kan göras varför kronbladen måste samlas in i tidig blomning. Under de senaste tio åren har insatser gjorts för att utveckla metoder för att detektera och identifiera växtpatogener baserade på DNA/RNA 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).

Syftet med projekt är öka precisionen i riskbedömningen genom att utveckla och anpassa DNA-baserade metoder för en effektiv kvantitativ bestämning av ascosporer av *S. sclerotiorum*. Bestämningar baserade på DNA-teknik valideras mot agartestet. Angreppsnivån av bomullsmögel i varje provtaget fält bestäms. Centralt i utvärderingen blir, förutom att validera DNA-analyserna, att bedöma värdet av kunskapen om odlingsdata från det aktuella fältet samt från omgivande fält.

Material och metoder

Agartest och fältgradering

Prover samlades in från 40 vårrapsfält under 2006 och 2007 i Örebro län samt från 20 höstrapsfält 2006 och 20 vårrapsfält 2007 i Östergötland. Från varje fält togs 20 toppskott strax före full blom. Toppskotten skars av jämt fördelat 20, 40, 60, 80 och 100 m från

fältkanten, och placerades i enskilda plastpåsar som lades i kylväska. Proverna förvarades svalt (+8°C) över natten innan kronbladen placerades på agarplattor med steril pipett. Kvarvarande blomställningar placerades sedan i frys, för vidare molekylärbiologiska undersökningar. Provhangeringsrutinerna förbättrades 2007 genom att 40 kronblad placerades individuellt direkt i 0.2 ml PCR-rör i syfte att kunna säkerställa att kronblad från ungefär samma bladnivå används till både agartest och PCR-analys. Infektionsnivån på kronbladen bestämdes med agartest enligt Morall et al. (1991). Fyra kronblad placerades på varje agarplatta och 20 plattor användes för varje fält. Plattorna inkuberades i rumstemperatur och avlästes efter 5-6 dagar. Ytterligare en avläsning gjordes en vecka senare. Antal kronblad som utvecklade sklerotier av bomullsmögel bestämdes. Gradering av angripna plantor i de provtagnafälten gjordes innan skörd i BBCH 80 då 100 plantor undersöktes längs provtagningssträckan ovan och bedömdes som friska eller angripna. Information om odlingshistoria har samlats in och en riskvärdering har gjorts för 24 fält. En kartläggning av närheten till fält där oljeväxter odlats nyligen har gjorts för att öka förklaringsgraden av vindspridning av ascosporer.

Realtids-PCR för detektion av *S. sclerotiorum* i kronblad

DNA-extraktion och rening

Sklerotier

S. sclerotiorum DNA från sklerotier extraherades med ett kommersiellt extraktionskit (FastDNA SPIN Kit for Soil, Qbiogene) som lyserar cellerna genom ett mekaniskt lyseringssteg. Extraktionen utfördes enligt tillverkarens instruktioner med undantaget att proven skakades 3x45 s på hastighet 5,5 med en Hybrid Ribolyser.

Apothecier

S. sclerotiorum DNA från apothecier extraherades med en vanlig CTAB-extraktion med kloroform enligt följande. Några apothecier placerades i ett 2 ml rör innehållande 6 stålkulor (2.3 mm i diameter). 1.5 ml CTAB-buffert (20 g CTAB, 12.11 g Tris, 81.8 g NaCl, 7.4 g Na₂-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) per liter vatten; pH = 8.0) tillsattes och proven homogeniserades därefter genom att skakas på en Ribolyser 45 s (speed 4.5). Efter tillsats av 20 µl Proteinase K (20 mg/ml, MERCK) inkuberades proven i 60°C under 2 h och centrifugerades sedan 5 min vid 13 000 rpm. 1 ml supernatant överfördes därefter till ett 1.5 ml eppendorfrör, blandades med 5 µl Rnase och inkuberades i 60°C under 15 min. Proven centrifugerades därefter 1 min vid maxhastighet (>15 000 xg). 900 µl av supernatanten fördes därpå över till ett nytt eppendorfrör och blandades med 600 µl kloroform. Efter 10 minuters centrifugering vid maxhastighet överfördes 625 µl av den övre fasen till ett nytt rör innehållande 1 µl glykogen. 500 µl isopropanol tillsattes och proven inkuberades i rumstemperatur under ca 30 min. Därefter centrifugerades proven återigen 10 min vid maxhastighet. Supernatanten hälldes försiktigt av och DNA-pelleten tvättades med 500 µl 75% EtOH. Efter 5 minuters centrifugering vid >10 000 xg pipetterades etanolen bort. Då resterande etanol evaporerat löstes pelleten i 100 µl sterilt milli-Q H₂O. DNA-extrakten förvarades i frys vid -20°C.

Kronblad från raps

Extraktion från poolade kronblad; DNA extraherades från totalt 8 eller 16 kronblad med FastDNA SPIN Kit for Soil (Qbiogene) enligt ett modifierat protokoll. Kronbladen plockades försiktigt med en steril pincett och placerades i Lysing Matrix E Tubes (Qbiogene). Därefter tillsattes 978 µl Sodium Phosphate Buffer (Qbiogene) och 122 µl MT Buffer (Qbiogene). Proven vortexades och skakades sedan 2x40 s på en Ribolyser (speed 6). Mellan skakningarna

samt efter sista skakningen kylde provet på is. Efter 5 minuters centrifugering vid 14 000 xg överfördes supernatanten till ett eppendorfrör och 250 µl PPS reagent (Qbiogene) tillsattes. Provet inverterades 10 gånger för hand och centrifugerades sedan ytterligare 5 min vid 14 000 xg. Supernatanten överfördes därefter till ett 15 ml rör innehållande 1 ml Binding Matrix Suspension (Qbiogene). Provet inverterades för hand 2 min och inkuberades sedan 3 min i rumstemperatur. 600 µl av den övre klara fasen pipetterades försiktigt bort. Därefter följdes protokollet enligt tillverkarens instruktioner.

Extraktion från ett kronblad; DNA från endast ett kronblad extraherades med en kommersiell buffert (MicroLYSIS-PLUS, Microzone) enligt ett modifierat protokoll (personlig kommunikation Jonathan West, Rothamsted Research, UK). Totalt togs 20 kronblad ut från varje fält som skulle analyseras med real-tids PCR. För samtliga fält utom fält 22 från 2006 gjordes två separata extraktioner (2x20 kronblad). Varje kronblad placerades i ett 0.2 ml PCR-rör och förbehandlades vid 95°C under 5 min. Därefter tillsattes 40 µl MicroLYSIS-PLUS (Microzone) och provet behandlades sedan två gånger med följande temperaturprogram:

Steg 1:	65°C under 15 min
Steg 2:	95°C under 2 min
Steg 3:	65°C under 4 min
Steg 4:	95°C under 1 min
Steg 5:	65°C under 1 min
Steg 6:	95°C under 30 s
Steg 7:	20°C

Provet vortexades mellan de två behandlingarna. Därefter tillsattes ca 2 mg PVP (polyvinylpyrrolidon) samt 40 µl TE-buffert (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA) och provet vortexades. Efter 15 min centrifugering vid 13 000 rpm överfördes 50 µl av supernatanten till ett nytt PCR-rör. 125 µl etanol samt 10 µl 7.5 M ammoniumacetat tillsattes och provet vortexades och centrifugerades sedan ytterligare 15 min vid 13 000 rpm. Supernatanten pipetterades bort och provet lufttorkades och resuspenderades sedan i 10 µl sterilt MQ-H₂O. DNA-extraktet förvarades i frys vid -20°C. Protokollet optimerades ytterligare för proverna uttagna 2007. Inkuberingen med etanol och ammoniumacetat förlängdes till minst 30 min vid -20°C och DNA resuspenderades i 50 µl sterilt MQ-H₂O.

PCR

Primrar och prob

Två olika primerpar har studerats och på grund av en högre grad av specificitet valdes det primerpar som är framtaget av Freeman et al. (2002). Primerparet amplifierar en sekvens på 278 baspar i *S. sclerotiorums* ribosomala DNA. En TaqManMGB-prob märkt med 6-FAM (6-carboxy-fluorescein) designades med hjälp av Primer Express och sekvenserna för primerparet samt proben visas i tabell 1 nedan.

Tabell 1. Sekvenser för primrar och prob.

Primer/prob	Sekvenser
Primer forward (SsFWD)	5'- GCT GCT CTT CGG GGC CTT GTA TGC -3'
Primer reverse (SsREV)	5'-TGA CAT GGA CTC AAT ACC AAG CTG -3'
Prob (SsMGB)	5'-CGC CAG AGA ATA TCA A -3'

Realtids-PCR med TaqManMGB-prob

Samtliga analyser med realtids-PCR utfördes på en 7300 Real Time PCR System från Applied Biosystems i en totalvolym på 25 µl. Reaktionen bestod av 1 x TaqMan Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems), 0.2 µM av varje primer, 0.2 µM av proben samt 1-5 µl

DNA extrakt. Förhållandena för realtids-PCR-reaktionen visas i tabell 2. Vid analys av kronblad extraherade med MicroLYSIS användes 1 µl DNA extrakt för prover uttagna 2006 samt 5 µl för prover uttagna 2007. Prover från 2006 analyserades i två replikat, men för att få en säkrare analys förbättrades metoden och samtliga prover från 2007 analyserades därför i tre replikat. Då två eller tre replikat var positiva ansågs provet som positivt.

Tabell 2. Temperaturprotokoll för realtids-PCR-analys med SsFWD, SsREV och SsMGB

Process	Tid (min:s)	Temperatur (°C)
Denaturering	10:00	95
Touchdown-PCR*	00:15	95
	01:00	72-66
Amplifiering 40 cykler	00:15	95
	01:00	65

*: Temperaturen sänks 1 grad varannan cykel.

Resultat

Agartest och fältgradering 2006

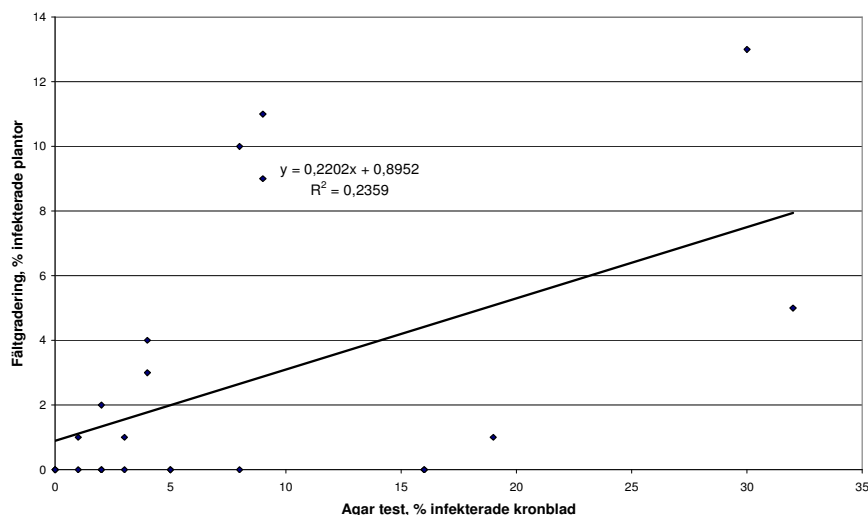
Försommaren och blomningsperioden var nederbördsfattiga (tabell 3), och förekomsten av sporer förhållandevis låg. Agartesterna från höstraps i Östergötland visade på låga nivåer; medelvärdet var 7,6 % angripna kronblad med en variation mellan 0 och 32,5 % (resultat visas ej här). Agartesterna från Örebro län visade ett medelvärde på 7,2 % med en variation mellan 0 och 32 %. Medelvärdet för angreppen i fält i Örebro län var 2,4 %, med en variation mellan 0 och 13 % (figur 1). Drygt hälften av fälten var helt utan angrepp. I Östergötland fanns inga angrepp i något av de graderade fälten. Den torra och varma väderleken under och efter blomning (Tabell 3) medförde att angreppen blev mycket låga.

Tabell 3. Nederbörd och temperatur i Örebro och Vikingstad (Östergötland) 2006 och 2007.

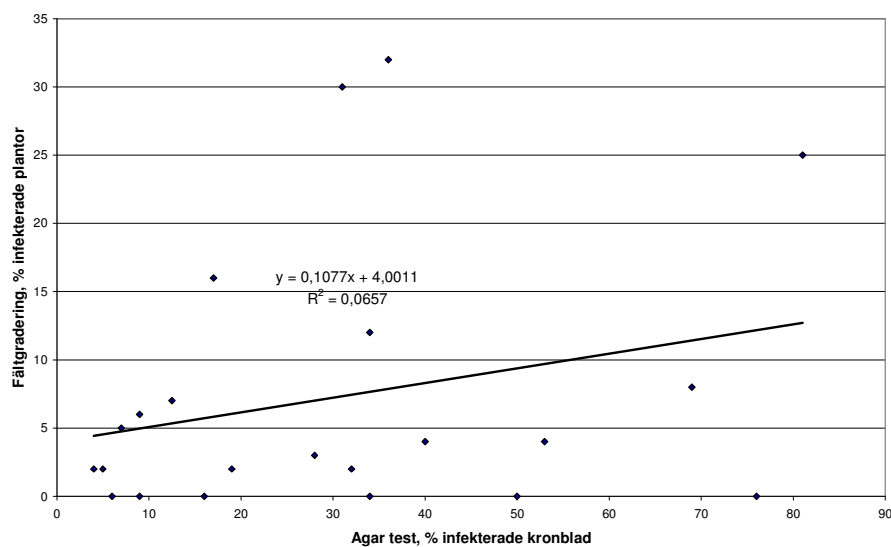
	Antal regndagar	Nederbörd mm	Medeltemperatur dygn, °C
Örebro			
2006 två veckor före blomning	6	37	
2006 under blomning	3	11	19,1
2007 två veckor före blomning	4	26	
2007 under blomning	10	67	15,3
Östergötland			
2006 två veckor före blomning	0	0	
2006 under blomning	1	6	20,0
2007 två veckor före blomning	2	14	
2007 under blomning	8	100	15,8

Agartest och fältgradering 2007

2007 visade agartesten höga infektionsnivåer till skillnad från 2006. De högsta nivåerna förekom i Örebro län. Agartesterna från Östergötland visade ett medelvärde på 10,9 procent infekterade kronblad med en variation mellan 1,4 och 30 procent (resultat visas ej här). I Örebro var medelvärdet 29,6 procent med en variation mellan 4 och 81 procent. Medelvärdet för fältinfektion i Örebro län var 7 procent med en variation mellan 0 och 32 procent, vilket inte motsvarades av infektionsivån på agarplattorna (figur 2). I Östergötland var medelvärdet 0,5 procent, då endast två fält av femton visade förekomst av bomullsmögel. Stor förekomst av gråmögel (*Botrytis spp*) avlästes på agarplattorna för Örebro län, vilket kan ha konkurrerat med *S. sclerotiorum* i fält. Endast svaga eller inga angrepp alls har konstaterats i fält där agarinfektionen var <20 procent (tabell 4).



Figur 1. Samband mellan agartest och fältangrepp i vårraps 2006, Örebro län.



Figur 2. Samband mellan agartest och fältangrepp i vårraps 2007, Örebro län.

Tabell 4. Fördelning av infektionsnivå i fält där bekämpningsbehov bedömdes enligt agartest.

Län	(Totalt antal undersökta fält)	Ant fält med bek behov enl. agartest ¹	Ant fält med angr >20 %	Antal fält med angr < 20 %	Antal fält utan infektion
Örebro	(22)	13	4	6	3
Östergötland	(15)	1	0	0	1

¹ Bekämpningsbehov föreligger enligt tidigare undersökningar vid 20 procent infekterade kronblad (Wallenhammar et al., 2007)

Utvärdering av riskvärderingen (www.ffe.slu.se/sve)

Av de provtagna fälten var föregående års oljeväxtodling känd i 24 fall, och resultaten av fältpassade riskvärderingar presenteras i tabell 5.

Tabell 5. Utvärdering av riskbedömningen för vårrapsfält där senaste oljeväxtodlingen är känd.

År	Angrepp i fält %	Riskbedömning poäng	Riskenivå	Angrepp agartest % infekterade kronblad
2006	0	25	Liten	0
	0	25	Liten	3
	0	25	Liten	0
	0	30	Liten	5
	0	25	Liten	8
	1	40	Liten	19
	5	50	Måttlig	32
	9	50	Måttlig	9
	13	30	måttlig	30
	2007	0	40	Liten
0		35	Liten	9
0		35	Liten	16
2		45	Måttlig	4
7		45	Måttlig	13
8		50	Måttlig	69
12		45	Måttlig	34
30		60	Stor	31
32		60	Stor	36
2007 E-län		0	40	Liten
	0	45	Måttlig	30
	0	55	Måttlig	16
	0	55	Måttlig	21
	0	65	Stor	6
	0	60	Stor	14

I fält där oljeväxter inte odlats de senaste 10 åren är risken oavsett väderlek låg. Poängen blir högre i frodiga fält med mycket regn och växlande väderlek. Om information om tidigare oljeväxtodling finns (tabell 5), är överensstämmelsen godtagbar, men för fält där denna information saknas blir väderleksparametrarna dominerande och riskvärderingen ger dålig överensstämmelse med angreppet (tabell 4). Här ökar kronbladstester precisionen. Vi konstaterar att i fält med infekterade kronblad och liten riskenivå har angreppen uteblivit när marksmittan varit låg (tabell 5).

Analys av fältprover

Två olika upplägg för kvantifiering av *S. sclerotiorum* i fältprover har undersökts. Den första strategin gick ut på att analysera DNA extraherat från 8 respektive 16 kronblad och sedan studera sambandet med resultatet från agartestet. Detta resulterade dock inte i någon korrelation mellan agartest och PCR (data visas ej).

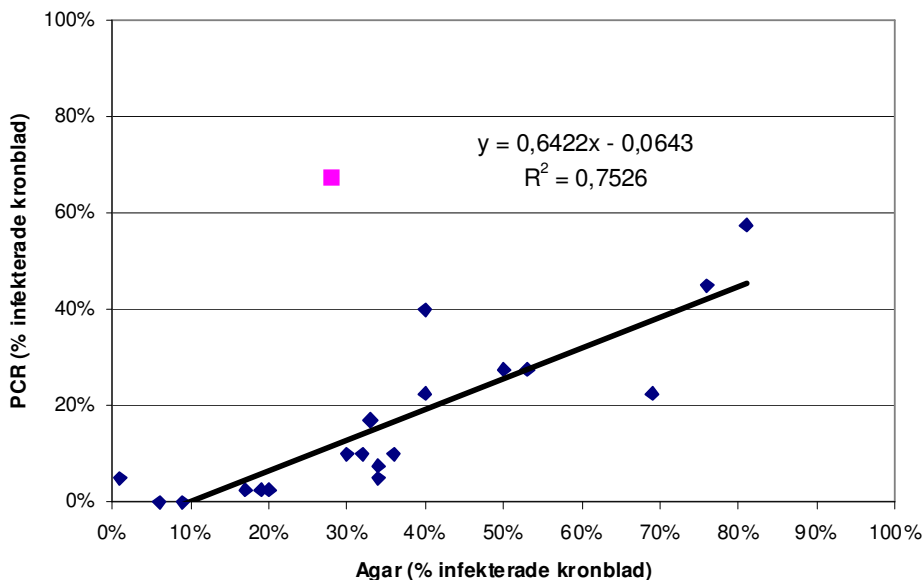
Den andra strategin för analys av fältprover gick ut på att ta reda på hur stor procentandel av kronbladen som var infekterade (men inte hur infekterade de var). För att få en hanterbar provmängd analyserades totalt 20 blad istället för 80 blad som används vid agartestet. DNA extraherades från dessa 20 blad och därefter utfördes en kvalitativ analys med realtids-PCR. I Tabell 6 visas resultatet från dessa analyser.

Tabell 6. Jämförelse av resultat från agartest samt realtids-PCR. Resultaten finns angivna i % infekterade kronblad och för PCR-analysen har prov räknats som positiva endast då två av två alternativt minst två av tre replikat blivit positiva. Medelvärde anger medelvärdet för två separata extraktioner och analyser.

År	Fält nr	Agartest		Realtids-PCR	
		(% infekterade kronblad)	Fältgradering (% angripna plantor)	(% infekterade kronblad)	Medelvärde realtids-PCR (%)
2006	24	40	5	35, 45	40
	40	33	13	28, 6	17
	37	17	0	0, 5	3
	22	6	0	0, 0	0
2007	42	81	25	40, 75	58
	30	76	0	60, 30	45
	38	53	4	30, 25	28
	46	36	32	10, 10	10
	44	40	4	15, 30	23
	25	69	8	10, 35	23
	29	9	0	0, 0	0
	33	50	0	15, 40	28
	26	34	0	0, 10	5
	20	32	2	5, 15	10
	28 ¹	20	i.u.	0, 5	3
	31	34	12	0, 15	8
	32	28	3	80, 55	68
	23 ¹	30	i.u.	10, 10	10
	43	19	2	5, 0	3
P	1	0	0, 10	5	

¹Fältet fungicidbehandlat, uppgift saknas

Resultatet från analyserna visas även i Figur 4 nedan där man tydligt ser en korrelation mellan agartestet och PCR-analysen.



Figur 4. Korrelation mellan agartest och medelvärden för PCR-analysen. Punkt (68;28) är ej med i kurvanpassningen.

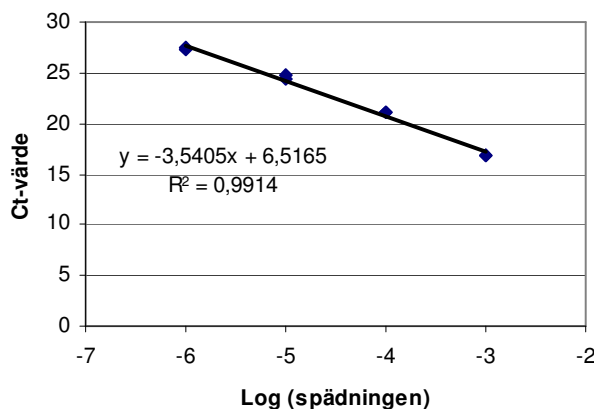
Specificitet

Primrarnas och probens specificitet undersöktes genom att jämföra sekvenserna med sekvensdata från databaser med hjälp av programmet BLAST (NCBI, National Center for

Biotechnology Information). Denna sökning visade att *S. sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, *S. minor* och *Sclerotinia* sp. förväntas påvisas med metoden. Specificiteten har också undersökts av Freeman et al. (2002) som då kom fram till ett liknande resultat. I och med detta samt att primrarna och proben amplifierar ett fragment i en variabel region av rDNA't är det högst osannolikt att andra svampar, som t.ex. *Botrytis cinerea* som orsakar gråmögel, ger upphov till en korsreaktion. Experimentella försök visar att *S. sclerotiorum* DNA från sklerotier, apothecier samt ascosporer på kronblad kan påvisas med denna Realtids-PCR-metod.

Amplifieringseffektivitet

Metodens amplifieringseffektivitet undersöktes genom att analysera en 10-faldig spädningsserie av DNA extraherat från *S. sclerotiorum* sklerotier. Resultatet visas i figur 5 och formeln för kurvan som anpassats visar att lutningen är -3.5405 vilket innebär en PCR-effektivitet på ca 92 % (100% motsvarar en fullständig fördubbling av målsekvensen i varje cykel). Även anpassningen av linjen är utmärkt ($R^2 > 0.99$).



Figur 5. Tiofaldig spädningsserie av sklerotie-DNA. Varje spädning har analyserats med Realtids-PCR i två replikat. Kurvan som anpassades till mätpunkterna gav en mycket hög korrelationsfaktor och PCR-effektiviteten beräknades till ca 92 %. Ct-värdet representerar det cykelnummer då fluorescensen stiger över bakgrundsbruset och överstiger ett godtyckligt gränsvärde.

Diskussion

Inledningsvis utvärderades två strategier för detektion och analys av *S. sclerotiorum* DNA på kronblad. Den första strategin baserades på DNA extraktion från samlingsprover (8-16 kronblad). Ingen korrelation mellan mängden *S. sclerotiorum* DNA och antal infekterade kronblad i agartestet kunde påvisas vilket kan bero på att om endast ett eller ett par av dessa 8 (eller 16) blad är mycket kraftigt infekterade resulterar det troligtvis i ett större utslag i analysen jämfört med om samtliga 8 (eller 16) blad endast har ett fåtal sporer vardera. Detsamma gäller däremot inte för agartestet, varför det blev problem då metoderna skulle jämföras. Angreppen i fält antas bli större om ett större antal blad har få sporer jämfört med om ett fåtal blad är väl koloniserade av svampen. Därför var det mer informativt att bestämma frekvensen genom att undersöka förekomsten av *S. sclerotiorum* på individuella kronblad.

Den Realtids-PCR-metod som vi har utvecklat erbjuder en snabb och tillförlitlig detektion av ascosporer på kronbladen, och är en viktig parameter i en förbättrad riskvärderingsmodell. Undersökningar visar att infektionseffektiviteten hos kronblad är ungefär sex gånger större än för ståndare, och att 10 % av infekterade kronblad leder till en stjälkinfektion (Young et al, 2007). Tidigare undersökningar (Wallenhammar et al., 2007) visar att en fungicidbehandling är ekonomiskt lönsam vid 20 % infekterade kronblad. Den rikliga nederbörden under blomningen kan ha orsakat alltför våta infektionsförhållanden. Brun et al. (1983) visade att kronblad som torkats i 100° i 1 timma eller torkats i rumstemperatur innan de placerades på rapsblad med en sporsuspension, ledde till 80-90 % infektion, medan endast ett fåtal lyckade

infektioner blev resultatet med färsk kronblad. Den låga sjukdomsförekomsten i fält under 2007 antyder att förhållandena under infektionsprocessen behöver undersökas ytterligare. Rogers *et al.* (2008) visar att bestämning av luftburen smitta som samlats in i sporfallor med realtids-PCR erbjuder ytterligare möjligheter att förbättra prognosen för ett sjukdomsutbrott.

Samtidigt visade utvärderingen av riskbedömningen att vid mycket torr väderlek (som 2006) är risken låg även i fält med angrepp tidigare i växtföljden, medan det båda åren förekom störst angrepp i fält med hög risk baserad på kunskap om tidigare angrepp. Vid större andel oljevaxter i växtföljden ökar behovet av kunskap om angrepp som förekommit tidigare, samt om vilken smitta som finns i fältet under det aktuella året, för att rätt kunna använda riskvärderingen. I en studie i Mellansverige var risken för angrepp 13 ggr större i fält som tidigare haft höga angrepp av bomullsmögel jämfört med fält som tidigare inte haft angrepp (Twengstöm, 1999). I studien framkommer också att storleken på tidigare angrepp är en av de viktigaste faktorerna för angrepp i den aktuella grödan, vilket har bekräftats i denna undersökning (tabell 5).

Vi har funnit att i parametern ”regional risk”, som baseras på sklerotiedepåernas groningsförmåga, värderas fuktigheten ytterligare en gång och föreslår att denna utesluts. Vi anser att parametrarna beståndstäthet och nederbörd innan blomning ger tillräcklig information. Angreppet 2006 var ett av de lägsta som förekommit under de 23 år som gradering av bomullsmögel utförts i Örebro län (Wallenhammar och Redner opubl), och i jämförelse med med agartesten som utfördes i ett tidigare projekt 1998-1999 är nivåerna som bestämts 2006-2007 lägre (Wallenhammar *et al.*, 2007). Under perioden före 1998 var oljeväxtodlingen mer omfattande och växtföljderna relativt ansträngda av oljevaxter medan förhållandena under de senaste åren varit omvända. Kunskapen om odlingshistoria och tidigare angrepp minskar dock när lantbruksföretagen blir större och nya marker tillkommer.

En hållbar produktion kan uppnås först när vi kostnadseffektivt kan detektera och förutsäga risken för angrepp i varje enskilt oljeväxtfält. Ökad precision beträffande behovet av förebyggande kemisk bekämpning ökar lantbrukarens ekonomi då ett antal bekämpningar som inte är nödvändiga kan undvikas. Tillgången till nya testmetoder innebär också att risken för oväntade angrepp minskar, och att tillförda insatsmedel och växtnäring utnyttjas bättre, jämfört med när skörden reduceras p g a ojämn brådmognad.

Med den real-tids PCR-metod som vi utvecklat kan smitta snabbt påvisas och precisionen i riskbedömningen ökas. Metoden har givit en bra vägledning i de fält där angrepp utvecklades. Undersökningen bekräftar också tidigare resultat (Wallenhammar och Sjöberg, 2000) att låg fältinfektion motsvarats av en låg infektion på kronbladen.

Publikationer

Referee-granskad tidskrift full paper

Wallenhammar, A-C., Almquist, C., Redner, A., och Sjöberg, A. 2008. Improved risk assessment of Sclerotinia stem rot in oilseed rape using real-time PCR., *Aspects of Applied Biology*, 89, In press

Referee-granskad konferens abstract

Wallenhammar, A-C., Almquist, C., Redner, A., och Sjöberg, A. 2008. Improved risk assessment of Sclerotinia stem rot in oilseed rape by quantitative PCR. *Proceedings of 9th International Congress on Plant Pathology*, August 24-29, 2008, Torino, Italy. *Journal of Plant Pathology* (2008), 90 (2, supplement) S2.313. 19.38.

Populärvetenskaplig publikation

Wallenhammar, A-C. 2008. DNA på kronbladen avslöjar bekämpningsbehovet. Arvensis,2, 13.

Resultatförmedling

Genomförda aktiviteter:

Sveakonferensen, Brunnby 15 januari ;Muntlig presentation ca 70 deltagare

Information till växtskyddscentralerna och rådgivare juni; Skriftlig information om projektresultat med e-post

International Congress on Plant Pathology, Turin 22-28 augusti ; Posterpresentation (1400 deltagare)

Planerade aktiviteter:

Applied aspects of Aerobiologi Rothamsted 19 november; Muntlig presentation

ÖSF- konferensen, Linköping 3 december; Muntlig presentation

Växjö möte 11 december; Muntlig presentation

Uddevallakonferensen 16 jan; Muntlig presentation

Workshop för Jordbruksverkets växtskyddscentraler, intresserade rådgivare och Svensk Raps
Planeras i februari/ mars 2009.

Referenser

Anonym. 2008. Riskvärdering för bomullsmögel i våroljeväxter. Hämtat från

<http://www.ffe.slu.se/sve> 15 november 2008.

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.

Freeman J., Ward E., Calderon C., McCartney A. 2002. A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum*. European Journal of Plant Pathology, 108: 887-886.

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.

Rogers, S.L., Atkins, S.D., Wets, J.S., Fitt, B.D.L. 2008. Detection and quantification of airborne ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum* by qPCR. Journal of Plant Pathology (2008), 90, S2.92.

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. och Sjöberg, A. (2000) Agartest- ett enkelt hjälpmedel vid riskbedömning av bomullsmögel i oljeväxter, 3:8-9.

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.

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.

Young, C Werner, P., West, J. 2007. Understanding *Sclerotinia* infection in oilseed rape to improve risk assessment and disease escape. HGCA Project Report 420.