

Skydd mot lagringssjukdomar i ekologiskt odlade äpplen



Hilde Nybom¹, Estera Dey², Masoud Ahmadi-Afzadi^{1,3} och Ibrahim Tahir³

¹Institutionen för växtförädling – Balsgård, Sveriges lantbruksuniversitet, Fjälkestadsvägen 459, 29194 Kristianstad

²Kemiska institutionen, Avdelningen för tillämpad biokemi, Lunds universitet, Box 124, 22100 Lund

³Institutionen för växtförädling, Sveriges lantbruksuniversitet, Box 101, 23053 Alnarp

Förord

Äpple är gott och nyttigt! Men det är inte alltid så lätt att få tag i frisk och fin frukt, och ska den dessutom vara lokalt odlad med miljövänliga metoder så blir det ännu svårare. Lönsamheten för de svenska odlarna är problematisk, med ett tuffare klimat än i många andra äppelproducerande länder och stark konkurrens från utländsk frukt.

Lagersjukdomar orsakade av olika svampar är en av de viktigaste anledningarna till att ekologiska äppelodlingar har ett signifikant större bortfall av försäljningsbar frukt jämfört med annan typ av odling. Även IP-odlingar kan drabbas av besvärande skador beroende bland annat på vilka äpplesorter man odlar.

Merparten av hittills utprovade icke-kemiska skyddsåtgärder har haft otillräcklig effekt eller varit dyrbara att använda. Applicering av olika typer av beläggning på äpplen innan skörd har dock visat sig ha en viss potential att kunna motverka lagersjukdomar.

Rågkli, som består av det yttre höljet kring rågkärnan, är en hittills underutnyttjad biprodukt av svensk rågsodling. Ur rågkli kan man utvinna olika icke-toxiska fenol-lipider som exempelvis alkylresorcinoler (AR).

En tvärvetenskaplig forskargrupp med kompetens inom äppelförädling och genetik (Professor Hilde Nybom, Balsgård, SLU), äppelodling och lagringssjukdomar (Dr Ibrahim Tahir, Alnarp/Balsgård, SLU) samt tillämpad biokemi och industriell utveckling (Docent Estera Dey, Lunds universitet) bildades 2011, och erhöll medel från SLU EkoForsk för ett tvåårigt projekt: 'Protection against storage diseases in organically grown apples'. Sedan anslöt sig även doktoranden Masoud Ahmadi-Afzadi, som doktorerar på lagringssjukdomar hos äpple på SLU.

Målsättningen har varit att undersöka om man kan utveckla ett biologiskt preparat med alkylresorcinoler (AR) som aktiv beståndsdel. Detta preparat ska sedan kunna användas för att bespruta fruktträd så att man erhåller ett skydd mot svampangrepp under fruktlagringen.

Här redogör vi för erhållna resultat samt diskuterar hur man kan gå vidare med detta projekt.

Balsgård, Alnarp och Lund, oktober 2013
Projektgruppen

Innehållsförteckning

Förord	2
Bakgrund	4
Material och metoder	5
<i>AR utvinns ur rågkli och kvaliteten kontrolleras</i>	
<i>Lösningar med AR tillverkas</i>	
<i>Äpplen inokuleras med svampsporer</i>	
<i>Första AR-försöket; juni 2011 – teknikutveckling</i>	
<i>Andra AR-försöket; juli 2011 – mer teknikutveckling</i>	
<i>Tredje AR-försöket; augusti 2011 – två utländska äpplesorter testas</i>	
<i>Fjärde AR-försöket; oktober 2011 – tre svenska äpplesorter testas</i>	
<i>Femte AR-försöket; två svampar och fyra svenska äpplesorter testas</i>	
<i>Sjätte AR-försöket; myceltillväxt och virulens</i>	
<i>Statistiska analyser</i>	
Resultat och diskussion	9
<i>AR-lösningarna – teknisk kvalitet</i>	
<i>Experimentell teknik.</i>	
<i>Effekt av 18 AR-lösningar på grönmögel hos två utländska äpplesorter</i>	
<i>Effekt av fyra AR-lösningar på grönmögel hos tre svenska äpplesorter</i>	
<i>Effekt av två AR-lösningar på två svampar hos fyra svenska äpplesorter</i>	
<i>Effekt av två AR-lösningar på myceltillväxt och virulens</i>	
Slutsatser och framtidsutsikter	18
Referenser	19
Resultatförmedling från projektet	20

Bakgrund

Skador uppkomna vid kylagring av äpple är en av de viktigaste orsakerna till att svensk äppelproduktion brottas med stora ekonomiska problem. Dessa skador kan uppgå till 10% eller mer av den inlagrade frukten och är speciellt förödande eftersom odlaren redan åsamkats betydande kostnader för växtskyddsbehandling, gallring, skörd, sortering och lagring innan man sedan tvingas kasta den förstörda frukten. Skadorna orsakas främst av svampsjukdomar som grönmögel *Penicillium expansum*, bitterröta *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*), olika arter av *Neofabraea* (*N. alba* och *N. perennans*; bull's eye rot', på svenska ibland kallad gloeosporiumröta eller *Pezicula*-röta) och gråmögel *Botrytis cinerea* (Børve och Stensvand 2007, Weber och Palm 2010). I Europa har dessa sjukdomar ökat signifikant under senare år, sannolikt beroende på klimatförändringen (Amiri et al. 2008, Weber och Roland 2009). Vi kan alltså förvänta oss att dessa angrepp kommer att bli ännu allvarigare efterhand som klimatet i Sverige blir allt varmare och troligen även fuktigare under vegetationsperioden.

Några helt resistent äpplesorter finns inte dokumenterade men man har noterat stor variation mellan sorter i deras tolerans för lagersjukdomarna (Tahir och Nybom 2008, Tahir et al. 2008, Ahmadi-Afzadi et al. 2013). De olika växtförädlingsprogrammen för äpple runt om i världen har hittills dock inte uppmärksammat lagersjukdomar i någon högre grad. I flertalet stora äppelproducerande länder "löser" man nämligen problemet genom att helt enkelt doppa frukten i en fungicid efter skörden eller möjligen i ett biologiskt medel som BioSave vilket innehåller *Pseudomonas syringae*. Även olika växtbaserade oljor har visat sig ha skyddande effekt (Amiri et al. 2008). Att doppa frukten i kemiska eller andra medel är inte tillåtet i Sverige, vare sig för ekologiskt eller konventionellt odlad frukt. Därigenom blir det än mer angeläget att lösa problemet med lagersjukdomar, så att inte svenskodlad frukt konkurreras ut av den utlandsproducerade.

Tidigare utförda odlings- och sortförsök inom äpple i Sverige (främst Balsgård och Kivik) har visat att just lagersjukdomar är en av de viktigaste anledningarna till att ekologiska odlingar har ett signifikant större bortfall av försäljningsbar frukt jämfört med annan typ av odling (Tahir och Nybom 2008, Tahir et al. 2008). För den populära sorten Aroma erhöll man ett 20 gånger större bortfall i ekologiskt odlade träd jämfört med IP-odlade träd på samma fält (Jönsson et al. 2010). Det finns för närvarande inga kemiska medel som är godkända inom ekologisk odling för kontroll av lagersjukdomar hos äpple. Mikrobiologiska organismer som jästsvampar och bakterier har visserligen visat sig ha effekt mot vissa lagersjukdomar som grönmögel (Nunes et al. 2007, Janisiewicz et al. 2008) men användningen av sådana preparat har oftast sämre effekt på *Neofabraea* som är den vanligaste sjukdomen i Sverige, och kan ha bieffekter som att exempelvis orsaka korkrost på skalet.

Den tillåtna användningen av kemiska fungicider innan skörd blir alltmer begränsad även för IP-odlare, speciellt för odlingar belägna på vattenskyddsområden. Det senare gäller stora delar av Österlen dit merparten av den svenska äppelproduktionen är lokaliserad. Ett annat problem är att flitig användning av de kemiska preparaten har resulterat i resistent stammar av de vanligaste svampsjukdomarna. Av de icke-kemiska metoderna är behandling med hett vatten mest välkänt (Spadaro et al. 2004, Neri et al. 2009) och ger god effekt även på *Neofabraea*, men denna metod är kostnadskrävande och resultaten är ibland motsägelsefulla eftersom man kan få oönskade effekter som skalbränna. Olika äpplesorter skiljer sig dessutom åt i sin känslighet för värmebehandlingen som därför måste utformas individuellt för varje sort.

Olika typer av beläggning på äpplen innan skörd har en viss potential att kunna motverka lagersjukdomar. Rågkli, som består av det yttersta skiktet av rågkornet, är en hittills underutnyttjad biprodukt av svensk rågsodling. Ur rågkli (det yttre höljet runt rågkärnan) kan man utvinna olika icke-toxiska fenol-lipider som exempelvis alkylresorcinoler (AR; Landberg et al. 2008, Fig. 1). Dessa ämnen ingår i en grupp av mycket intressanta antioxidanter som har en påvisad positiv effekt mot cancer, fetma, hjärt- och kärlsjukdomar samt diabetes typ 2 (Hajer et al., 2008, Andersson et al. 2011). AR från rågkli har visat sig kunna inhibera tillväxt av olika brödsvampar *in vitro* (Reiss 1989) samt minska skadorna av olika växtpatogena svampar hos mango (Droby et al. 1987, Hassan et al. 2007).

Målsättningen för vårt arbete har varit att undersöka om man kan minska angreppen av lagringssjukdomar hos äpple genom att applicera ett biologiskt preparat med alkylresorcinoler som aktiv beståndsdel. I framtiden skulle i så fall detta preparat kunna användas för att bespruta fruktträd så att man erhåller ett skydd mot svampangrepp under fruktlagringen.

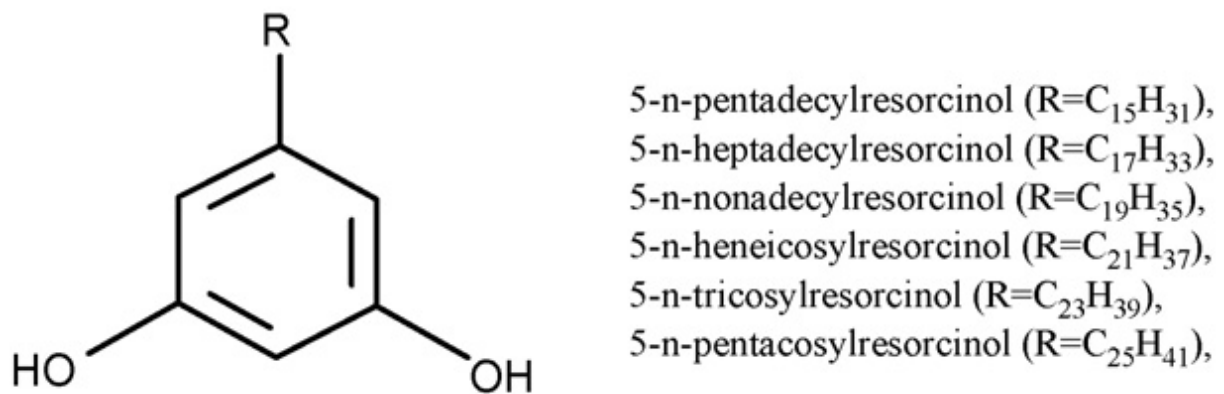


Fig. 1. Kemisk struktur för 5-(n)-alkylresorcinoler med olika acylkedjor

Material och metoder

AR utvinns ur rågkli och kvaliteten kontrolleras

Vi inledde det experimentella arbetet vårvintern 2011 med att utvinna alkylresorcinoler. Utgångsmaterialet var rågkli som inskaffades från Nord Mills i Malmö, och som hade en partikelstorlek på 0,5–1 mm. För att framställa en så ren produkt som möjligt, användes superkritisk koldioxidextraktion i två steg (Dey och Mikhailopulo 2009). Denna metod bygger på att man applicerar ett mycket högt tryck så att fasgränsen mellan vätska och gas luckras upp. Den resulterande superkritiska vätskan kan både diffundera genom fasta ämnen som en gas, och lösa upp ämnen som en vätska, och är därför ett synnerligen effektivt extraktionsmedel.

Koncentrationen av AR i den erhållna produkten kvantifierades först med spektrofotometri. Därefter användes preparativ högtrycksvätskekromatografi (HPLC), fastfas extraktion (SPE) och tunnskiktscromatografi (HPTLC) för att kontrollera kvaliteten och fastställa den exakta mängden ren AR.

Lösningar med AR tillverkas

Därefter var det dags att undersöka vilka olika medel som kan användas i kombination med AR för att få en god effekt av applikation på frukt med sprayning. Intorkade och noggrant uppmätta mängder av AR-extrakt löstes upp i två olika lösningsmedel (Synperonic 91/6 respektive polydimetylsiloxan). Därefter tillsattes olika emulgeringsmedel (PEG 400, NaCl, CaCl₂ respektive Tween 20) och konsistensgivare (xanthan gum och gum arabic). Varje lösning späddes sedan upp med destillerat vatten till 30 ml, och kom därmed att innehålla 0,025% respektive 0,05% AR. Lösningarna homogeniserades med en Ultra Turrax (13,500 varv per minut i en minut), och fotograferades i mikroskop för att dokumentera droppstorleken. De färdiga lösningarna förvarades sedan i +8 °C tills att de skulle användas. Innan användning värmdes AR-lösningen upp till 37 °C i 30 min, skakades kraftigt och fördes över till en sprayflaska med vars hjälp den sedan applicerades på frukten.

Tabell 1. Innehållet i 19 olika AR-lösningar, som testades på grönmögelinokulerad frukt.

AR lösning	Innehåll										
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k
1	0.025	0.1	-	0.5	-	0.2	1	2	2	5	-
2	0.025	0.2	-	0.5	-	0.2	1	2	1	2.5	-
3	0.025	0.1	-	1	-	0.2	1	0.5	2	2.5	-
4	0.025	0.2	-	1	-	0.2	-	0.5	1	2.5	-
5	0.025	0.1	-	1	-	1	1	2	2	5	-
6	0.025	0.2	-	0.5	-	1	-	0.5	1	2.5	-
7	0.025	0.1	-	1	-	1	1	2	2	2.5	-
8	0.025	0.2	-	2	-	1	1	2	2	5	-
9	0.025	0.1	-	1.5		1.5		2	1	5	
10	0.025	0.1	-		1.5		1.5	2	0.5	5	
11	0.025	0.1	-	-	0.5	0.2	1	2	2	-	5
12	0.025	0.2	-	-	0.5	0.2	1	2	1	-	5
13	0.025	0.05	-	-	1	0.2	1	-	2	-	5
14	0.025	0.1	-	-	1	0.2	-	0.5	1	-	5
15	0.025	0.05	-	-	0.5	1	1	-	1	-	5
16	0.025	0.1	-	-	0.5	1	-	0.1	2	-	5
17	0.025	0.05	-	-	1	1	-	0.1	1	-	5
18	0.05	0.2	-	-	0.5	0.2	1	2	2	-	5
131	0.025	0.2	0.15	-	0.5	0.2	1	2	2	-	5

a Alkylresorcinoler, % (m/v); b xanthan gum, % (m/v); c gum arabic, % (m/v);
d Synperonic 91/6, % (m/v); e polydimetylsiloxan, % (m/v); f Tween 20, % (m/v);
g trioleate, % (m/v); h oleylalkohol, % (m/v); i PEG 400, % (m/v); j CaCl₂, % (m/v);
k NaCl, % (m/v).

Äpplen inokuleras med svampsporer

Eftersom det skulle bli tidsödande och besvärligt att mäta effekten av AR på spontant förekommande svampangrepp, valde vi att istället använda oss av frukt som inokulerats med svampsporer enligt metoder som tidigare tillämpats inom vår forskargrupp (Tahir et al. 2009, Nybom et al. 2012). Aktivt växande grönmögel i frukt av äpplesorten Aroma flyttades över till en petriskål med ett lämpligt medium för svamptillväxt (potatisdextros agar). Efter 10 dagars tillväxt samlades konidiesporer upp med en glasstav och fördes över till en vattenlösning som filtrerades och späddes till en koncentration av 100.000 sporer per ml.

Konidiesporer utvanns på samma sätt från aktivt växande *Neofabraea perennans* men här odlades svampen istället på petriskålar med maltextrakt agar.

Alla inokuleringarna utfördes på Balsgård. Frukten tvättades först med vatten för att avlägsna spontant förekommande ytliga svampinfektioner. Sedan injicerades 20 mikroliter av spörlösningen med en pipett, som stacks in ca 4 mm i frukten. Varje frukt inokulerades på två sidor, och förvarades sedan i rumstemperatur tills att spörlösningen torkat in.

Första AR-försöket; juni 2011 – teknikutveckling

I juni 2011 genomfördes den första serien experiment med applicering av AR på frukt. Vi använde importerade Granny Smith-äpplen, som inokulerades med sporer av grönmögel. Vi inokulerade dels hela frukter och dels tunna skivor av frukten; tre frukter respektive tre fruktskivor användes för varje försöksled. Fem–sex timmar efter inokuleringen sprayades frukterna och fruktskivorna med en serie av 18 olika AR-innehållande lösningar (AR 1 – AR 18, Tabell 1). Efter sju dagar i rumstemperatur, mättes ytan på den uppkomna skadan, dvs de synliga sjukdomssymptomen. Resultaten för de hela frukterna blev utmärkta men det visade sig att äppleskivorna blev så kraftigt angripna att det inte gick att kvantifiera symptomen ordentligt.

Andra AR-försöket; juli 2011 – mer teknikutveckling

Nästa serie experiment utfördes på importerad frukt av Golden Delicious. Denna gång inokulerades hela frukter, halverade frukter samt fruktskivor med grönmögelssporer som ovan. Samma 18 lösningar användes som tidigare. Mängden symptom avlästes efter 6 dagar i rumstemperatur. Återigen goda resultat för de hela frukterna medan skadorna på fruktskivorna var svårare att utvärdera. Därför beslöt vi att fortsättningsvis arbeta enbart med hela frukter.

Tredje AR-försöket; augusti 2011 – två utländska äpplesorter testas

I den tredje serien av experiment använde vi importerad frukt av Royal Gala (mycket mottaglig för grönmögel) och Golden Delicious (relativt resistent mot grönmögel), vilka behandlades med 18 AR-lösningar som tidigare. Sex hela frukter av varje sort användes för varje försöksled. Varje frukt sprayades med 10 ml rumstempererad AR-lösning.

Varje behandlad frukt lades sedan i en försluten plastlåda som placerades i en kylbox, 90% relativ luftfuktighet och +2 °C för tre veckors lagring. Därefter fick lådan med frukten stå i rumstemperatur under ytterligare fem dagar för att efterlikna hanteringen i handelsledet. Diametern på varje svampangrepp mättes med linjal i två vinkelräta riktningar varefter medelvärdet användes som ett mått på angreppets storlek.

Fjärde AR-försöket; hösten 2011 – tre svenska äpplesorter testas

Under hösten 2011 fick vi äntligen tillgång till svensk frukt, och då valde vi att arbeta med sorterna Ingrid Marie (ganska mottaglig för grönmögel), Gloster (ganska resistent) och Frida (ganska resistent). All frukt skördades i en yrkesodling i Kivik. Mognadsstadiet fastställdes genom att mäta torrsubstansinnehållet (sockerhalt), fastheten (med en penetrometer), utföra ett jod-test (mäter stärkelsens omvandling till socker) samt produktionen av etylen (gaskromatografi). Ingrid Marie var något mer mogen än övriga två men alla befann sig fortfarande i ett preklimakteriskt stadium lämpat för skörd av frukt som ska lagras under en längre period.

Hela frukter av de tre sorterna inokulerades med grönmögel. Eftersom samtliga har både gult (skuggsida) och rött (solsida) på frukten, lade vi ett inokuleringsställe på skuggsidan och ett

på solsidan av varje frukt. Fyra speciellt utvalda AR-lösningar sprayades på den inokulerade frukten, samt även en kontrollösning (vatten). Dessutom ingick icke-sprayade kontrollfrukter också i försöket. I varje försöksled (sort x AR-lösning eller kontroll) ingick 15 frukter. Frukten förvarades under 6 veckor i kyl respektive rumstemperatur som ovan, innan symptomen avlästes.

Femte AR-försöket, två svampar och fyra svenska äpplesorter testas

Baserat på de tidigare resultaten för 2011, valdes de två mest lovande AR-lösningarna ut för fortsatta experiment. Båda dessa lösningar innehåller 0.025% AR, 0.2% Tween 20, 1% trioleate, 2% oleylalkohol och 2% PEG400. Dessutom innehåller den första lösningen (AR 1) även lösningsmedlet Synperonic 91/6 och 5% CaCl₂ medan den andra lösningen (AR 11) innehåller polydimetylsiloxan och 5% NaCl.

Frukt av fyra svenskodlade äpplesorter, Aroma, Ingrid Marie, Frida och Gloster, skördades i Kivik på samma sätt som beskrivits ovan, med beräkning av mognadsstadium (stärkelseindex och Streif index) (Tabell 2). Dessutom mätte även färgen på sol- och skuggsida med hjälp av en kolorimeter.

Tabell 2. Frukten mognadsstadium och färg vid skörd. Streif index = fasthet/(torrsubstanshalt x stärkelseindex). Färgindex räknas ut enligt en formel baserad på mätvärden för röd färg, gul färg och ljushet.

Säsong	Sort	Skörd	Stärkelseindex	Streif index	Färgindex	
					solsida	skuggsida
2011	Aroma	Sept 10	4.1	0.17	4.4	-4.0
	Ingrid Marie	Sept 22	3.9	0.16	11.6	8.2
	Frida	Sept 26	4.1	0.17	9.3	6.8
	Gloster	Nov 11	4.7	0.17	8.9	5.0
2012	Aroma	Sept 18	4.4	0.16	17.8	-3.1
	Ingrid Marie	Okt 9	4.3	0.15	48.6	-5.0
	Frida	Okt 18	4.2	0.16	25.2	-1.1

Hösten 2011 inokulerades fyra x 15 frukter med grönmögel för varje äpplesort. För alla sorter utom Gloster upprepades dessa inokuleringar 2012, och då inokulerade vi även fyra x 15 frukter med *Neofabraea*. Ett försöksled (15 frukter) för varje svamp förblev osprayat som kontroll medan ett annat sprayades med vatten. Övriga två försöksled sprayades med AR 1 respektive AR 11. Frukten lagrades sedan i +2 °C under 12 veckor. Skadorna på grönmögelinokulerad frukt mättes direkt efter uttag från lagret medan *Neofabraea*-inokulerad frukt hölls i rumstemperatur (+18 °C och 80% relativ luftfuktighet). Skadorna mättes sedan som ovan.

Sjätte AR-försöket; svampmyceltillväxt och virulens

Petriskålar med potatisdextros agar autoklaverades och sedan tillsattes AR 1 eller AR 11 respektive inget alls (kontroll). Efter tre timmar vid 4 °C tillsattes mycel av grönmögel till varje petriskål. I nästa försöksled tillsattes istället först svampmycelet och tre timmar senare sprayades AR-lösningarna direkt på petriskålarna. På samma sätt tillsattes mycel av *Neofabraea* och de två AR-lösningarna till petriskålar med maltextrakt agar. Av varje försöksled tillverkades minst tre petriskålar. Efteråt förseglades petriskålarna med parafilm och inkuberades i 21 dagar vid +20 °C. Efter de 21 dagarna gjordes en subjektiv uppskattning

av mängden svampmycel i varje petriskål, och effekten av AR-lösningarna beräknades som procent myceltillväxt i behandlade petriskålar jämfört med myceltillväxten i kontrollskålarna.

När vi hade utvärderat myceltillväxten, skrapade vi av konidiesporerna från varje petriskål och förde över dem i en vattenlösning. Denna filtrerades och sedan beräknades sporkoncentrationen under mikroskop med hemacytometer. Lösningar med standardiserad sporkoncentration från varje petriskål användes sedan till att inokulera frukt av Aroma på samma sätt som ovan. Till varje spornlösning använde vi fem äpplen. Dessa frukter inkuberades under en vecka vid +20 °C. Därefter mättes skadornas storlek som ovan. Slutligen beräknade vi AR-lösningarnas effekt på skadeutvecklingen som procent av skadan på osprayad frukt.

Statistiska analyser

Skillnader mellan försöksleden i mängden sjukdomssymptom undersöktes med olika typer av variansanalyser (oneway anova, multiway anova, mixed model anova) av arcsin- och kvadratrotstransformerade data. Signifikanta skillnader mellan medelvärdena för de olika försöksleden fastställdes med Fisher's LSD respektive Tukey's HSD.

Resultat och diskussion

AR-lösningarna – teknisk kvalitet

Utbyte och kvalitet av AR bedömdes vara mycket tillfredsställande. Men för att verkligen ha en hämmande effekt på svampens tillväxt, måste det färdiga preparatet också fastna ordentligt på frukten, och stanna kvar tillräckligt länge. För att uppnå detta, måste man sätta till en del ämnen. Dessa tillsatser får dock inte hämma den aktiva substansens verkan, inte vara toxiska, och heller inte för dyra. För att det färdiga preparatet ska kunna bli godkänt som ett växtstärkande medel inom ekologisk odling, måste alla ingående substanser dessutom vara acceptabla enligt regelverket.

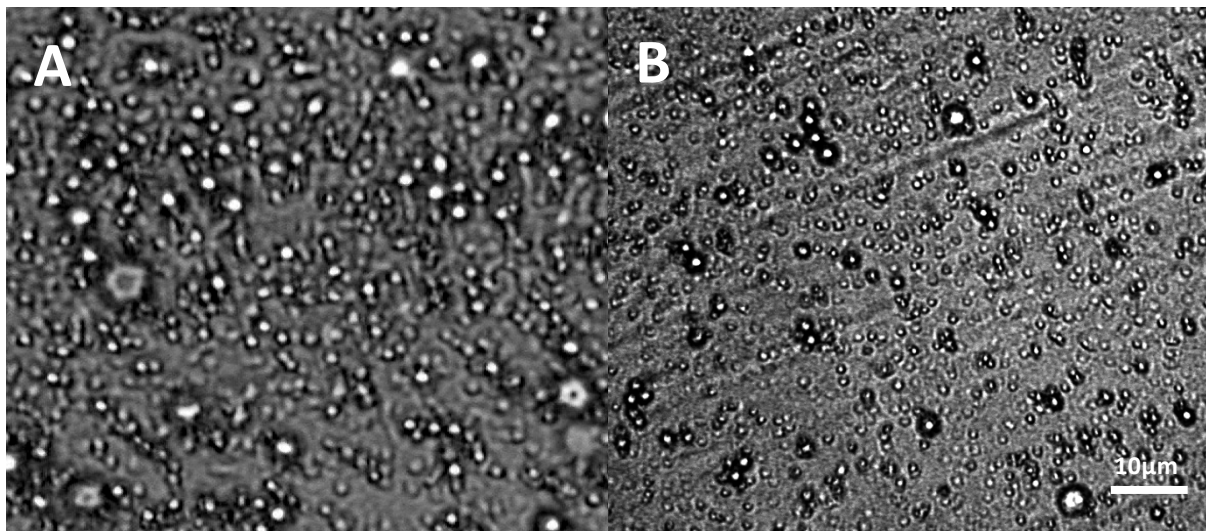


Fig. 2. Foto av två olika AR-lösningar i mikroskop, (A) AR 11 och (B) AR 131 som har högre mängd konsistensgivare (xanthan gum och gum arabic).

De olika lösningarna i våra experiment skiljde sig märkbart åt i droppstorlek och fysikalisk stabilitet (Fig. 2; dvs. om de olika komponenterna börjar separera eller om lösningen förblir homogen) men detta tycktes inte påverka lösningarnas effektivitet i någon högre utsträckning.

Experimentell teknik

Vi testade olika metoder att utföra inokuleringarna och de påföljande AR-sprayningarna, och använde därför hela frukter, halverade frukter respektive skivor av frukt. Dessvärre visade det svår att tolka resultaten från halverade frukter och skivor av frukt svårtolkade på grund av alltför ojämn svamptillväxt. Vi beslöt därför att bara använda den vanliga standardmetoden, dvs. inokulering av hela frukter (Fig. 3 och Fig 4).



Fig. 3. Grönmögelinokulerade frukter av Golden Delicious.



Fig. 4. Grönmögelinokulerade frukter av Ingrid Marie: (1) frukt som sprayats med AR 1, (water) frukt som sprayats med vatten, (control) frukt som inte sprayats alls.

Effekt av 18 AR-lösningar på grönmögel hos två utländska äpplesorter

Importerad frukt av Royal Gala och Golden Delicious inokulerades med grönmögel och behandlades därefter med 18 AR-lösningar (se Tabell 1 för sammansättning av varje lösning). Den genomsnittliga skadan blev 82 mm på obehandlad kontrollfrukt av den mycket mottagliga sorten Royal Gala och 59 mm på den något mer motståndskraftiga Golden Delicious (Tabell 3). Den behandlade frukten fick signifikant mindre skadesymptom men med mycket stora skillnader mellan de olika AR-lösningarna. Bäst resultat, dvs kraftigast inhibition, erhöles med AR 1, AR 2, AR 11 och AR 12, vilka producerade 92–100% inhibition hos Royal Gala och 63–87% inhibition hos Golden Delicious. Även AR 6 och AR 13 hade god effekt på grönmögelsskadorna hos båda äpplesorterna.

Tabell 3. Applikation av 18 AR-lösningar samt storlek på de resulterande grönmögelsskadorna i mm respektive i % av skadans storlek jämfört med skadan på osprayad kontrollfrukt.

AR-lösning	Royal Gala		Golden Delicious	
	Skadans storlek (mm)	Inhibition (%)	Skadans storlek (mm)	Inhibition (%)
Kontroll	82 a ^z	0	59 a	0
1	4 hi	95	8 k	87
2	7 hi	92	11 jk	81
3	71 b	13	20 efgh	67
4	51 de	38	23 cde	61
5	57 cd	31	20 efgh	67
6	14 gh	83	15 ij	74
7	58 cd	30	24 bcd	59
8	63 bc	23	16 ghi	73
9	50 de	39	28 b	53
10	48 de	41	25 bc	58
11	0 i	100	22 cde	63
12	0 i	100	17 fghi	71
13	23 g	72	11 jk	81
14	58 cd	30	16 hi	74
15	55 cd	33	10 k	84
16	50 de	39	21 cdef	65
17	44 ef	46	20 defg	66
18	34 cdef	58	15 ij	75

^z Medelvärden som följs av olika bokstäver, inom samma kolumn, skiljer sig åt signifikant, $p \leq 0.05$.

Effekt av fyra AR-lösningar på grönmögel hos tre svenska äpplesorter

Hösten 2011 hade äntligen den svenska frukten mognat, så att vi kunde testa tre viktiga handelssorter i Sverige, nämligen Ingrid Marie, Gloster och Frida. Denna gången testades bara fyra AR-lösningar (Tabell 4). AR 1 och AR 11 hade redan producerat mycket goda resultat i föregående försök, och skiljer sig bara i valet av lösningsmedel samt tillsats av CaCl₂ respektive NaCl. Dessutom ansåg vi att AR 18, som innehåller dubbelt så hög koncentration av AR som övriga, också kunde vara intressant liksom den tidigare ej provade AR 131 som har högre mängd konsistensgivare (både xanthan gum och gum arabicum) än övriga lösningar och som hade visat bättre fysikalisk-kemisk stabilitet. Av dessa fyra AR-lösningar var det dock bara AR 1 som skiljde sig signifikant från övriga (Fig. 5), med 33% inhibition för Ingrid Marie, 59% för Frida och 62% för Gloster. Några genomgående

skillnader på storleken hos skador på fruktens solsida respektive fruktens skuggsida kunde vi inte se (Tabell 4).

Tabell 4. Applikation av 4 AR-lösningar samt storlek på de resulterande grönmögelskadorna i mm respektive i % av skadans storlek jämfört med skadan på osprayad kontrollfrukt.

AR-lösning	Ingrid Marie		Frida		Gloster		Ingrid Marie		Frida		Gloster	
	Skada (mm)	Inhibition (%)	Skada (mm)	Inhibition (%)	Skada (mm)	Inhibition (%)	1 ^y	2 ^y	1 ^y	2 ^y	1 ^y	2 ^y
Obehandlad	31.5 ab	0	31.0 a	0	31.0 a	0	34	29	34	28	33	29
Vatten	39.0 a	-3	33.0 a	-7	24.5 ab	20	39	39	35	31	27	22
1	21.0 c	33	12.5 b	59	11.5 c	62	20	22	13	12	11	12
11	22.5 bc	17	14.5 b	54	16.5 bc	46	19	26	17	12	16	17
131	20.5 c	33	19.0 b	40	16.0 c	49	21	20	22	16	14	18
18	20.5 c	35	-	-	17.5 bc	43	23	18			17	18

1^ySkadans storlek i mm på fruktens skuggsida; 2^ySkadans storlek i mm på fruktens solsida

^z Medelvärden som följs av olika bokstäver, inom samma kolumn, skiljer sig åt signifikant, $p \leq 0.05$.

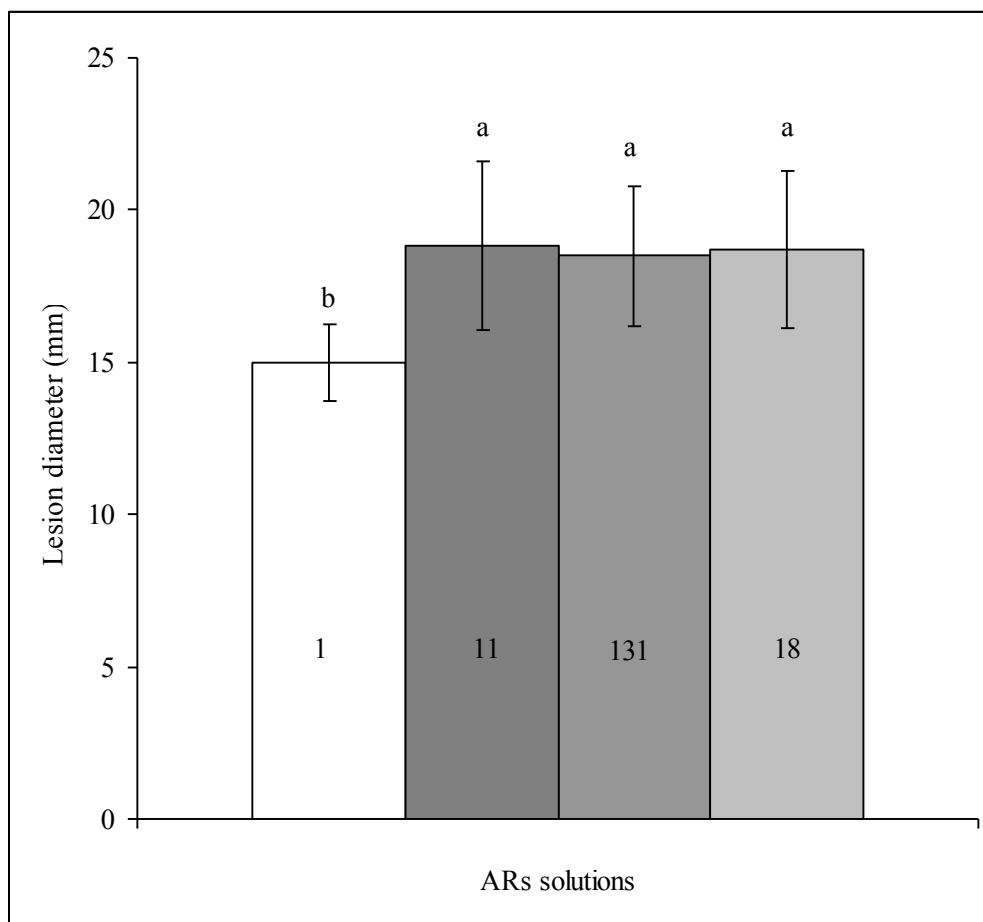


Fig. 5. Jämförelse av AR-lösningarnas förmåga att inhibera grönmögelskadorna hos tre olika äpplesorter. Staplarna anger medelvärdet för skadans storlek på frukt som sprayats med AR 1, AR 11, AR 131 respektive AR 18. Staplar med olika bokstäver skiljer sig åt signifikant ($p \leq 0.05$). Här har vi slagit samman värdena för alla tre äpplesorterna och de två inokuleringsställena på varje frukt (solsidan och skuggsida). Vi fann emellertid en signifikant interaktion mellan AR-lösningar och inokuleringsställe $p \leq 0.001$, och mellan AR-lösningar och olika äpplesorter $p \leq 0.007$, och mellan AR-lösningar, inokuleringsställe och sorter $p \leq 0.024$.

Effekt av två AR-lösningar på två svampar hos fyra svenska äpplesorter

De fyra äpplesorterna var skördade i samma mognadsstadium men skiljde sig åt markant i mottaglighet för de båda svampsjukdomarna, och det var dessutom inte någon samstämmighet mellan sorternas mottaglighet för de två olika svamparna (Fig. 6). Aroma var sålunda den sorten som var mest mottaglig för grönmögel men den var ändå betydligt mindre mottaglig för *Neofabraea* jämfört med Ingrid Marie och Frida.

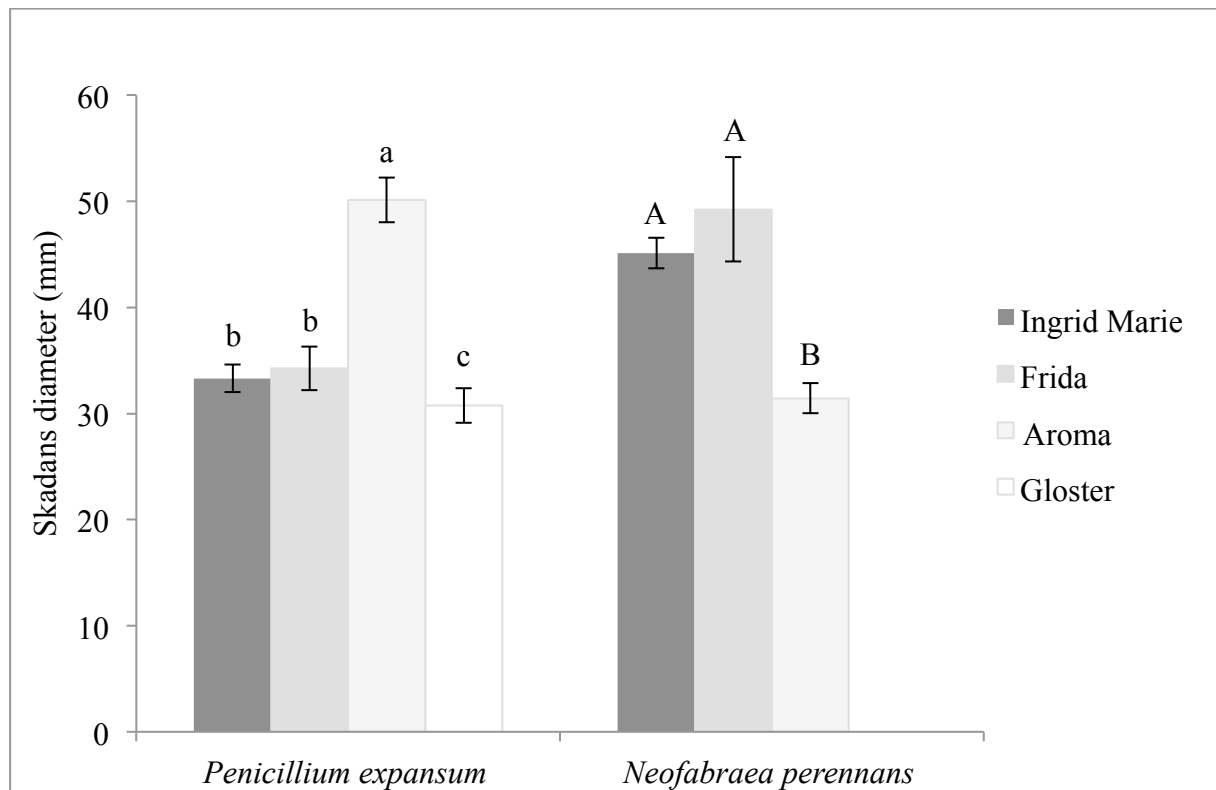


Fig. 6. Mottaglighet för grönmögel, beräknat som genomsnittlig storlek på den resulterande skadan hos frukt som inokulerats med grönmögel respektive *Neofabraea*. Staplar med olika bokstäver skiljer sig åt signifikant ($p \leq 0.05$).

De olika sorterna skiljde sig också åt när det gäller graden av det skydd som AR-lösningarna kunde ge (Tabell 5, Fig. 9). Jämfört med osprayad frukt, inhiberades skadorna av grönmögel med 17, 28, 39 respektive 52% för Aroma, Ingrid Marie, Frida och Gloster (Fig. 7). För *Neofabraea*, blev inhibitionen 77, 74 respektive 31% för Aroma, Ingrid Marie och Frida (Gloster var inte med i denna delen av försöket) (Fig. 8).

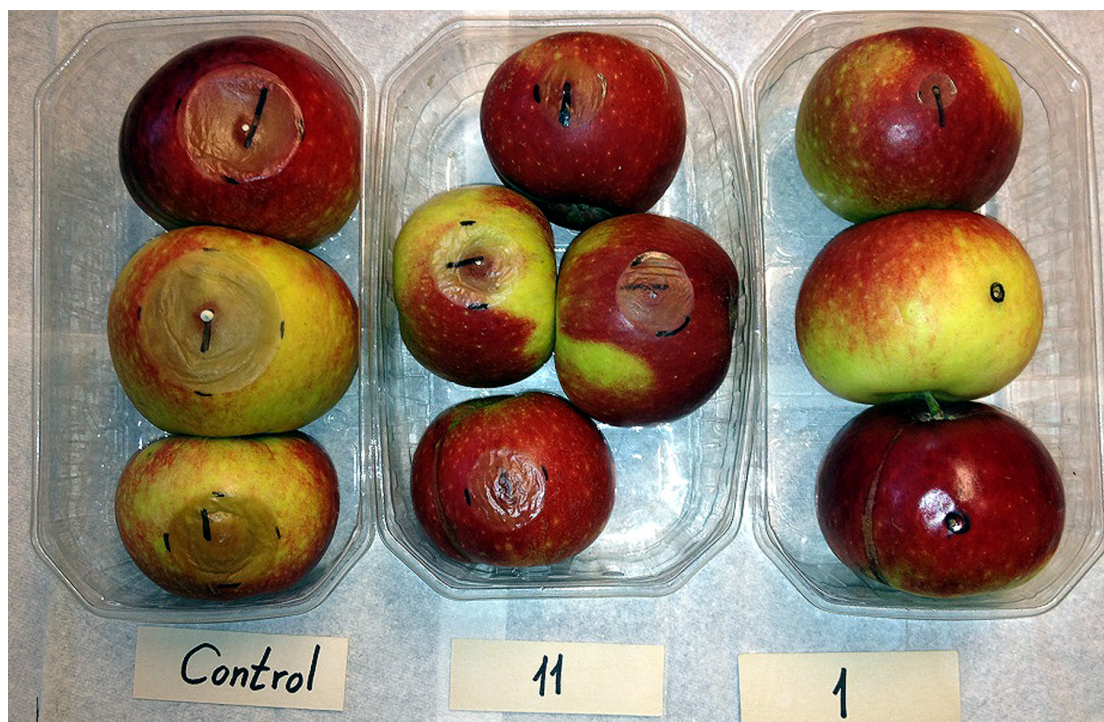


Fig. 7. Grönmögelinokulerade frukter av Ingrid Marie: (1) (control) frukt som inte sprayats alls, (11) frukt som sprayats med AR 11, (1) frukt som sprayats med AR 1.



Fig. 8. *Neofabraea*-inokulerade frukter av Aroma: (1) (control) frukt som inte sprayats alls, (11) frukt som sprayats med AR 11, (1) frukt som sprayats med AR 1.

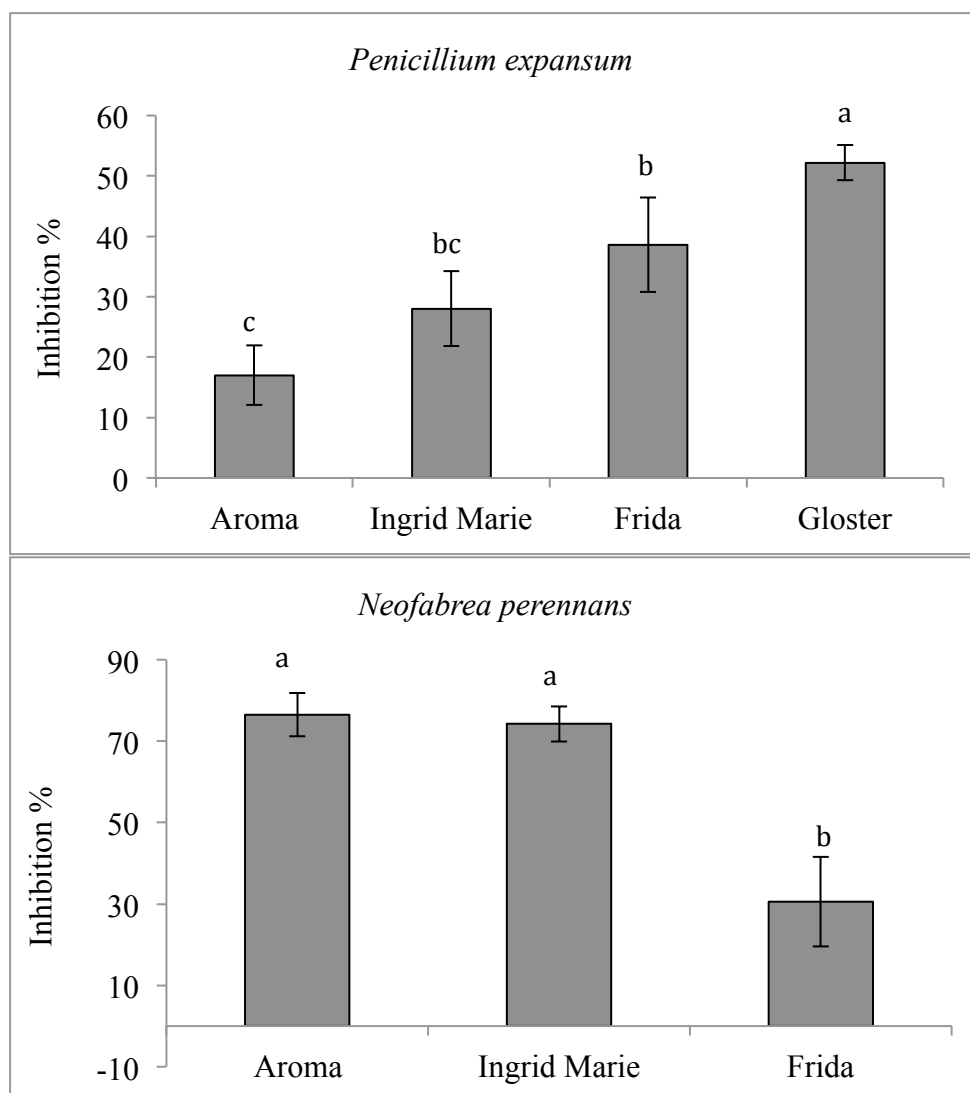


Fig. 9. Genomsnittlig procentuell inhibition av svampskador efter behandling med de två AR-lösningarna. Staplar för samma svamp men med olika bokstäver, skiljer sig åt signifikant ($p \leq 0.05$).

Generellt kan man konstatera att sorter med relativt liten mottaglighet för en viss svampsjukdom på kontrollfrukten också drog mest nytta av skyddet från AR-lösningarna (Tabell 5). Omvänt kan man också uttrycka det som att sorter med störst behov av skydd tyvärr var svårast att skydda.

Skadorna var genomgående något mindre på solsidan av frukterna, men skillnaden var signifikant endast för skadorna av *Neofabraea* hos Aroma (Tabell 5). Tidigare studier har visat att solsidan på äpplen vanligen innehåller mer antocyaner och vax, och är mer motståndskraftig mot svampsjukdomar (Tahir et al. 2009). I andra studier har olika äpplesorter dock skiljt sig åt i relativ känslighet för solsida och skuggsida, och det verkar svårt att dra några generella slutsatser (Ahmadi-Afzadi et al. 2013).

Tabell 5. Applikation av 2 AR-lösningar samt storlek på skadorna i mm för fyra äpplesorter och två svampar (*P.e Penicillium expansum*, *N.p Neofabraea perennans*). Genomsnittliga skadan på solsida respektive skuggsida uppges också. En interaktion mellan olika parametrar var signifikant: behandling x sida för Aroma inokulerad med *Neofabraea*.

Behandling	'Ingrid Marie'		'Frida'		'Aroma'		'Gloster'
	<i>P.e</i>	<i>N.p</i>	<i>P.e</i>	<i>N.p</i>	<i>P.e</i>	<i>N.p</i>	<i>P.e</i>
10 ml ARs 1	20.0 c ^z	9.6 b	20.0 b	30.3 b	37.5 b	1.0 c	11.6 b
10 ml ARs 11	28.1 b	13.6 b	22.1 b	32.7 ab	45.2 a	14.0 b	16.6 b
10 ml warm water	35.0 a	46.7 a	35.1 a	50.0 a	46.5 a	32.1 a	29.6 a
Kontroll	33.0 a	45.2 a	34.2 a	49.0 a	50.3 a	31.0 a	30.8 a
Solsida	29.0 a	39.0 a	26.5 a	39.0 a	44.2 a	17.5 b	21.4 a
Skuggsida	29.0 a	42.0 a	29.5 a	42.0 a	45.7 a	21.5 a	22.9 a
Behandling x sida	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	*	NS
Behandling x säsong	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns

^z Medelvärden som följs av olika bokstäver, inom samma kolumn, skiljer sig åt signifikant, $p \leq 0.05$
Ns = inte signifikant

Effekt av två AR-lösningar på myceltillväxt och virulens

Tillsats av AR-lösningarna till petriskålar tre timmar innan mycelet fördes över, resulterade i en sämre myceltillväxt under de påföljande tre veckornas inkubation, men effekten var signifikant endast för AR 1-behandlade petriskålar med *Neofabraea* (Tabell 6). Betydligt kraftigare inhibition erhöles när vi sprayade AR-lösningarna på petriskålarna tre timmar efter att svampmycelet tillsatts (Fig. 10). Särskilt AR 1 utmärkte sig, med 71 och 77% inhibition av myceltillväxten hos grönmögel respektive *Neofabraea* (Tabell 6).

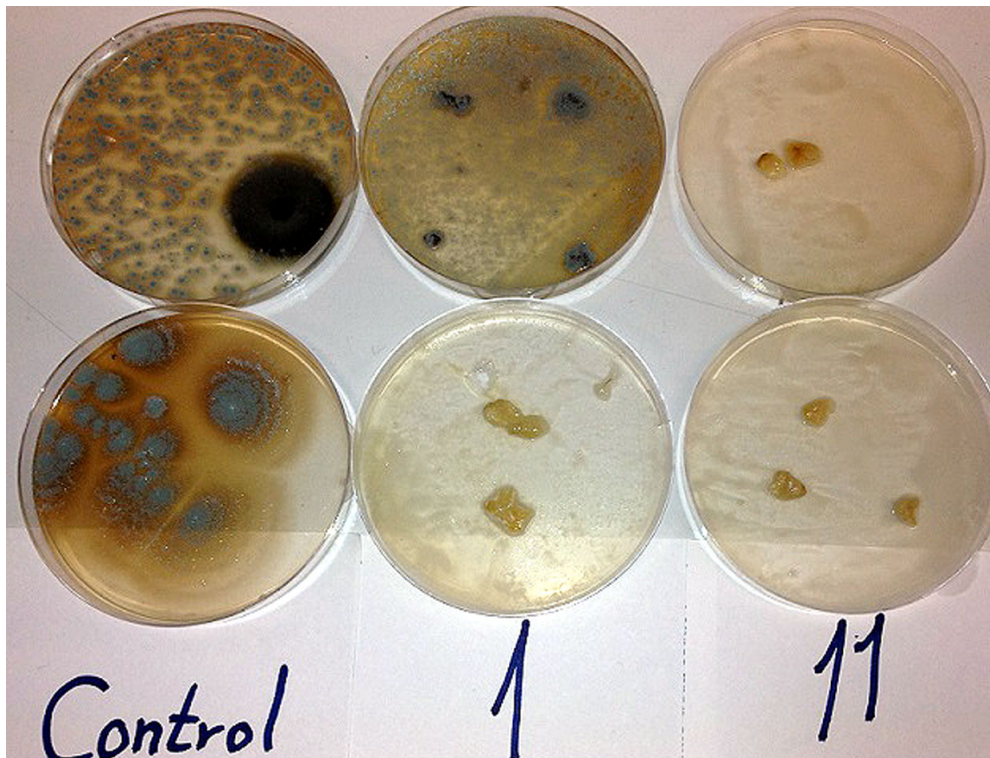


Fig. 10. Myceltillväxt hos grönmögel: (control) petriskålar som inte sprayats, (1) petriskålar som sprayats med AR 1 tre timmar efter att mycelet tillsatts, (11) petriskålar som sprayats med AR 11 tre timmar efter att mycelet tillsatts.

Tabell 6. AR-lösningarnas effekt på myceltillväxt *in vitro* av *P. expansum* respektive *N. perennans* på petriskålar med potatisdextros agar (PDA) respektive maltextrakt agar (MEA).

Svamp	Behandling	AR tillsatt 3 tim innan inokul.		AR spray 3 tim efter inokul.	
		Symptom (mm)	Inhibition (%)	Symptom (mm)	Inhibition (%)
<i>P. expansum</i>	ARs 1	69.0 b ^z	24.0 a	24.3 c	71.0 a
	ARs 11	72.0 b	21.0 a	41.7 b	50.0 b
	Kontroll	90.7 a		83.3 a	
<i>N. perennans</i>	ARs 1	31.3 b	46.0 a	10.3 c	77.0 a
	ARs 11	42.0 ab	27.5 b	25.3 b	43.0 b
	Kontroll	58.0 a		44.3 a	

^z Medelvärden som följs av olika bokstäver, inom samma kolumn och svamp, skiljer sig åt signifikant, $p \leq 0.05$

När vi därefter inokulerade Aroma äpplen med inokulum som vi fått genom att skrapa av sporer från de AR-sprayade petriskålarna, fick vi signifikant mindre skador än när vi använde sporer från obehandlade kontroll-petriskålar (Fig. 11). AR-behandlingarna hade alltså förmåga att begränsa svamparnas virulens. För grönmögel, visade AR 1 bäst förmåga att begränsa virulensen medan de två AR-lösningarna inte skiljde sig åt i sin förmåga att begränsa virulensen hos *Neofabraea*. När vi inokulerade Aroma äpplen med sporer som vi istället fått från petriskålar där AR-lösningarna tillsatts innan mycelet, fick vi inga signifikanta begränsningar av virulensen för någon av svamparna (Fig. 12).

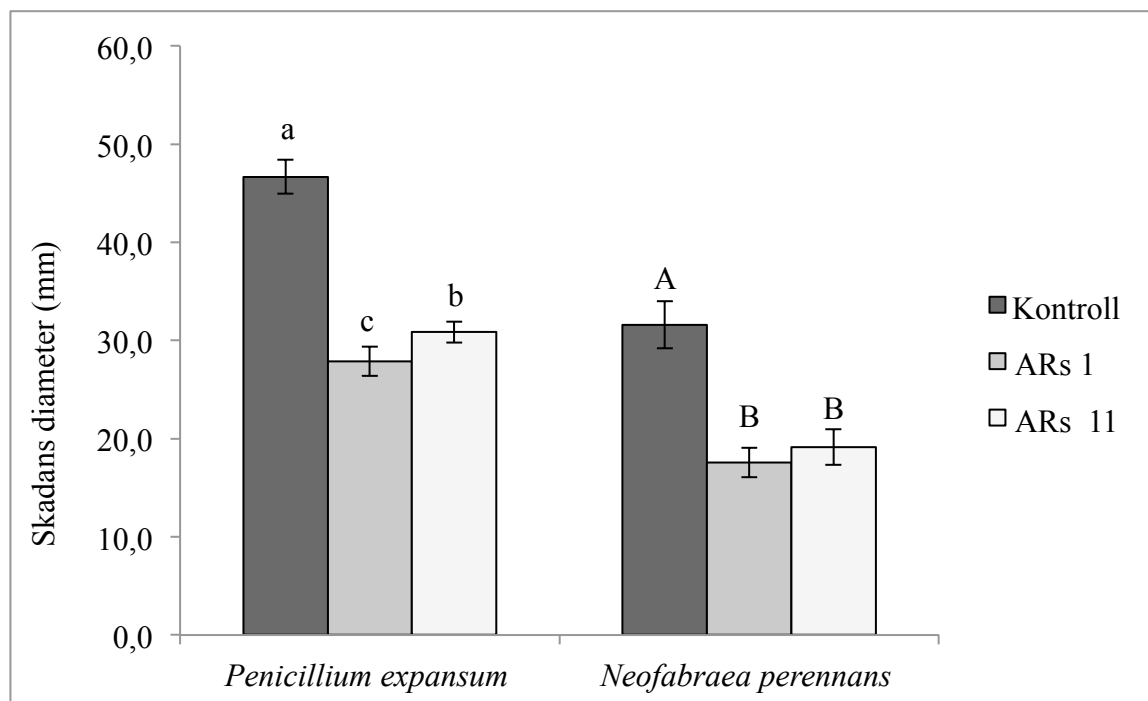


Fig. 11. Effekt av AR 1 och AR 11 på virulensen hos grönmögel och *Neofabraea*, beräknad som storleken av skador på frukter av Aroma. Dessa frukter hade inokulerats med sporer från petriskålar som sprayats med AR-lösningar tre timmar efter att de först försetts med svampmycel. Staplar för samma svamp men med olika bokstäver, skiljer sig åt signifikant ($p \leq 0.05$).

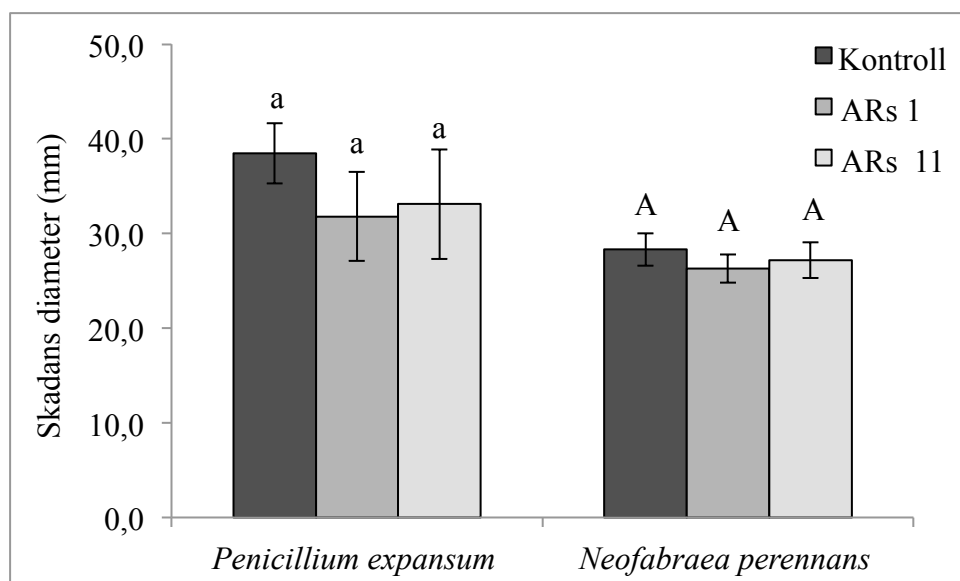


Fig. 12. Effekt av AR 1 och AR 11 på virulensen hos grönmögel och *Neofabraea*, beräknad som storleken av skador på frukter av Aroma. Dessa frukter hade inokulerats med sporer från petriskålar som hade behandlats med AR-lösningar tre timmar innan de försetts med svampmycel. Staplar för samma svamp men med olika bokstäver, skiljer sig åt signifikant ($p \leq 0.05$).

Slutsatser och framtidsutsikter

Vi har nu utfört ett antal försök med sammanlagt 19 olika AR-lösningar, som vi sprayat på frukter som strax dessförinnan inokulerats med grönmögel eller *Neofabraea*. Merparten av dessa lösningar har resulterat i signifikant minskade skador på frukten jämfört med kontrollfrukt som inte behandlats alls eller bara sprayats med vatten.

Den effektivaste lösningen hittills är AR 1, men det finns ytterligare några andra som visat genomgående signifikant minskade sjukdomssymptom. AR 1 har också visat god förmåga att begränsa såväl myceltillväxt in vitro som virulens hos konidiesporer bildade på mycel i behandlade petriskålar.

Innan vi kan initiera ett mera storskaligt utvecklingsarbete av AR som växtstärkande medel för kontroll av lagringssjukdomar, måste vi även ha data från fältförsök. Det är ju viktigt att ta reda på i vad mån AR-lösningarna kan skydda även frukter med naturliga svampinfektioner, och om en applicering i fält kan ge skydd flera veckor/månader senare under lagringsperioden.

Ett litet pilotprojekt har därför utförts 2013, med nio träd av Aroma. Tre av dessa sprutades med AR 1 (500 ml/träd) i full blom (andra veckan i maj) och tre veckor innan skörd (15:e augusti). Tre träd sprutades endast vid det andra tillfället och de övriga tre träden sprutades inte alls (kontroll). Frukten skördades i september enligt mognadsindex. Frukt från vart och ett av försöksleden delades upp i tre grupper. Den första gruppen sprayades med AR 1. Frukten i övriga två grupper inokulerades med grönmögel. Den ena av dessa grupper sprayades dessutom med AR 1 strax efter inokuleringen. Utvärderingen är inte klar ännu, men en preliminär utvärdering tyder på att mängden fruktmögel (*Monilia* spp) är mindre i träd som behandlats med AR 1. Denna typ av fältförsök bör upprepas i större skala, med fler äpplesorter och med inokulering av den skördade frukten med fler svampsjukdomar.

Referenser

- Ahmadi-Afzadi M, Tahir I, Dey ES, Nybom H. 2013. Alkylresorcinols (AR) isolated from rye bran can protect apples from fungal storage diseases. Poster at VIPCA Conference on Plant Genetics and Breeding Technologies in Vienna, Austria.
- Ahmadi-Afzadi M, Tahir I, Nybom H. 2013. Impact of harvesting time and fruit firmness on the tolerance to fungal storage diseases in an apple germplasm collection. *Postharvest Biol. Technol.* 82: 51–58.
- Amiri A, Dugas R, Pichot A, Bompeix G. 2008. In vitro and in vitro activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 13–19.
- Andersson U, Dey SE, Holm C, Degerman E. 2011. Rye bran alkylresorcinols suppress adipocytes lipolysis and hormon-sensitive lipase activity. *Molec. Nutrition Food Res.* 55: S290–S293.
- Børve J, Stensvand A. 2007. *Colletotrichum acutatum* found on apple buds in Norway. *Plant Health Progress* doi, 10.1094/PHP-0522-01-RS.
- Dey ES, Mikhailopulo K. 2009. A food grade approach for the isolation of major alkylresorcinols (ARs) from rye bran applying tailored supercritical carbon dioxide (scCO₂) extraction combined with HPLC. *J. Supercrit. Fluids* 51: 167–173.
- Dey ES, Ahmadi-Afzadi M, Nybom H, Tahir I. 2013. Alkylresorcinols isolated from rye bran by supercritical fluid of carbon dioxide and suspended in a food-grade emulsion show activity against *Penicillium expansum* on apples. *Arch. Phytopathol. Plant Protect.* 46: 105–119.
- Droby S, Prusky D, Jacoby B, Goldman A. 1987. Induction of antifungal resorcinols in flesh of unripe mango fruits and its relation to latent infection by *Alternaria alternata*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30: 285–292.
- Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FLJ. 2008. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Europ. Heart J.* 29: 2959–2971.
- Hassan MK, Dann EK, Irving DE, Coates LM. 2007. Concentration of constitutive alk(en)ylresorcinol in peel of commercial mango varieties and resistance to postharvest anthracnose. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 71: 158–165.
- Janisiewicz WJ, Saftner RA, Conway WS, Yoder KS. 2008. Control of blue mold decay of apple during commercial controlled atmosphere storage with yeast antagonists and sodium bicarbonate. *Postharvest Biol. Technol.* 49: 374–378.
- Jönsson Å, Nybom H, Rumpunen K. 2010. Fungal disease and fruit quality in an apple orchard converted from integrated production to organic production. *J. Sustain. Agricult.* 34: 15–37.
- Landberg R, Andersson AAM, Aaman P, Kamal-Eldin P. 2009. Comparison of GC and colorimetry for the determination of alkylresorcinol homologues in cereal grains and products. *Food Chemistry* 113: 1363–1369.
- Levi F, Pasche C, Lucchini F, Chatenoud L, La Vecchia C. 2000. Refined and whole grain cereals and the risk of oral, desophageal and laryngeal cancer. *Eur. J. Clin. Nutr.* 54: 487–498.
- Neri F, Mari M, Brigati S, Bertolini P. 2009. Control of *Neofabraea alba* by plant volatile compounds and hot water. *Postharvest Biol. Technol.* 51: 425–430.
- Nybom H, Ahmadi-Afzadi M, Garkava-Gustavsson L, Sehic J, Tahir I. 2012. Selection for improved fruit texture and storability in apple. *Acta Horticult.* 934: 849–854.
- Reiss J. 1989. Influence of alkylresorcinols from rye and related compounds on the growth of food-borne molds. *Cereal Chem.* 66: 491–493.

- Spadaro D, Garibaldi A, Gullino ML. 2004. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. *Postharvest Biol. Technol.* 33: 141–151.
- Tahir I, Nybom H. 2008. Jämförande försök med skorvresistenta äpplesorter. Fakta från Partnerskap Alnarp, 8, 1–4.
- Tahir II, Jönsson Å, Nybom H. 2008. Äpplesorter för ekologisk odling. *Frukt & Bär* 2008 (10): 18–21.
- Tahir II, Johansson E, Olsson ME. 2009. Improvement of apple quality and storability by a combination of heat treatment and controlled atmosphere storage. *HortScience* 44: 1648–1654.
- Weber RWS, Roland WS. 2009. An evaluation of possible effects of climate change of pathogenic fungi in apple production using fruit rots as examples. *Erwerbsobstbau* 51: 115–120.
- Weber RWS, Palm G. 2010. Resistance of storage rot fungi *Neofabraea perennans*, *N. alba*, *Glomerella acutata* and *Neonectria galligena* against thiophanate-methyl in Northern German apple production. *J. Plant Dis. Protect.* 117: 185–191.
- Zainuri DE, Irving EK, Dann LM, Coates A, Wearing H. 2013. Alk(en)ylresorcinol concentrations in ‘Kensington Pride’ mango peel and antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta Hort.* 975: 217–222.

Resultatförmedling från projektet

- Ahmadi-Afzadi M, Tahir I, Dey ES, Nybom H. 2012. Resistance and protection of apples from storage diseases. 2nd Symposium on Horticulture in Europe, 1–5 juli, Angers, Poster.
- Ahmadi-Afzadi M, Tahir I, Dey ES, Nybom H. 2012. Alkylresorcinols isolated from rye bran can protect apples from fungal storage diseases. International Conference on Plant Breeding and Breeding Technologies, 16–19 februari 2013, Wien, Poster.
- Dey ES, Ahmadi-Afzadi M, Nybom H, Tahir I. 2013. Alkylresorcinols isolated from rye bran by supercritical fluid of carbon dioxide and suspended in a food-grade emulsion show activity against *Penicillium expansum* on apples. *Arch. Phytopathol. Plant Protect.* 46: 105–119.
- Tahir I, Ahmadi-Afzadi M, Nybom H, Dey ES. Alkylresorcinols isolated from rye bran inhibit growth of *Penicillium expansum* and *Neofabraea perennans* in vitro and on fungal-inoculated fruits of four apple cultivars. Manuskript insänt.

Dessutom har projektet presenterats vid ett antal seminarier med odlare, rådgivare och/eller forskare som målgrupper, t ex Äppeldagen på SLU 2012-02-09 (<http://www.slu.se/sv/fakulteter/ltj/om-fakulteten/institutioner-vaxtskyddsbiologi/forskning/integrerat-vaxtskydd/>).