

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Innholdsfortegnelse

FORORD:	3
SAMMENDRAG:	4
ABSTRACT:	5
FORKORTELSER:	7
KAPITTEL 1 - INNLEDNING	8
BAKGRUNN:.....	8
<i>Fusarium graminearum</i>	11
MÅLSETTING MED OPPGAVEN.....	16
Vekstrate.....	16
Aggressivitet.....	16
Perithecieproduksjon.....	17
Sammenheng mellom de ulike egenskapene hos de 22 isolatene av <i>F. graminearum</i>	17
KAPITTEL 2 - MATERIALER OG METODE	18
ISOLATER AV <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i>	18
VEKSTRATE.....	19
Måling av vekstrate.....	20
AGGRESSIVITET.....	22
Tillaging av inokulum.....	22
Høsting av sporer.....	24
Plantemateriale.....	25
Inokulering.....	26
Registrering av <i>F. graminearum</i> angrep i hvete.....	28
PERITHECIEPRODUKSJON.....	28
Dyrking av sopp for produksjon av perithecier.....	28
Registrering av perithecieproduksjon.....	29
KAPITTEL 3 - RESULTATER	31
VEKSTRATE.....	31
AGGRESSIVITET.....	37
PERITHECIEPRODUKSJON.....	39
SAMMENHENG MELLOM DE ULIKE EGENSAPENE HOS DE 22 ISOLATENE AV <i>F. GRAMINEARUM</i>	42
KAPITTEL 4 - DISKUSJON	44
SAMMENFATTENDE DISKUSJON.....	49
KONKLUSJON	51
VEDLEGG	53
VEDLEGG 1: OPPSKRIFTER.....	53
SNA (<i>Spezieller Nährstoffarmer Agar</i>).....	53
Vannagar.....	53
PDA (<i>Potato Dextrose Agar</i>).....	53
Gulrotagar/Carrot Agar (CA).....	54
Mung Bean Agar (MBA).....	54
VEDLEGG 2: AFLP DENDOGRAM FOR ISOLATER AV <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i>	55
VEDLEGG 3: ETIKETT FORBEL 750.....	56
VEDLEGG 4A: STATISTIKK AGGRESSIVITET FRA MINITAB:.....	56
VEDLEGG 4B: STATISTIKK VEKSTRATE FRA MINITAB:.....	57
VEDLEGG 4C: STATISTIKK PERITHECIEPRODUKSJON FRA MINITAB:.....	59

VEDLEGG 4D: STATISTIKK KORRELASJON MELLOM AGGRESSIVITET OG VEKSTRATE FRA MINITAB:.....	60
VEDLEGG 4E: SAMMENLIGNING PERITHECIEPRODUKSJON MOT VEKSTRATE VED KORRESPONDERENDE TEMPERATURER (UTEN ISOLAT 137/08).	63
VEDLEGG 4F: SAMMENLIGNINGER GJENNOMSNITTLIG PERITHECIEPRODUKSJON MOT VEKSTRATE OG AGGRESSIVITET (UTEN ISOLAT 137/08 OG 34/08).....	64
VEDLEGG 5: ANALYSETALL GJØDSELVANN.....	68
REFERANSER:	69

Forord:

Denne oppgaven er min avslutning på 5 års studier ved Universitetet for miljø- og biovitenskap på studieretning Plantevitenskap, Jord- og hagebruk. Oppgaven ble valgt ut på grunnlag av forslag fra professor Anne Marte Tronsmo. Denne oppgaven har vært en del av Bioforsk Plante helses Fusariumprosjekt som har gått fra 2006 og fram til 2009. Jeg er meget takknemlig for at jeg fikk være en del av dette arbeidet.

Jeg ønsker først og fremst å takke mine to veiledere, professor Anne Marte Tronsmo og forsker Ingerd Skow Hofgaard, for meget god oppfølging og hjelp gjennom hele arbeidet med denne oppgaven.

Jeg ønsker også å takke Ely Gauslaa for hjelp på lab og i veksthus, Torfinn Torp for hjelp med statistikken og Jafar Razzaghian og Heidi Aamodt for gode råd underveis.

Ås, 14. Mai 2010

Gunnar Bræck Larsen

Sammendrag:

Fusarium graminearum er et økende problem i kornproduksjon i Norge og store deler av verden. Dette er problematisk både på grunn av avlingsreduksjoner og særlig produksjon av mykotoksiner. Grunnene til dette er trolig flere; klimaendringer har gitt bedre forhold for soppen, det er mer bruk av redusert jordarbeiding, og det er muligens endring av soppisolatenes egenskaper.

I denne oppgaven ble det sett på om en av årsakene til en økt forekomst av *F. graminearum* er at soppens egenskaper har endret seg. Egenskapene aggressivitet, veksthastighet og produksjon av perithecier ble studert i 22 enkeltsporeisolater samlet fra kornprøver i Norge. Disse var valgt ut på grunnlag av tidspunkt for funn og hvordan de var beslektet ut fra AFLP undersøkelser. Kategoriene var gamle isolater, nye isolater som var nært beslektet med gamle og nye isolater som ikke var nær beslektet med gamle. Disse ble delt opp i gruppene "ny" og "gammel" genotype.

Aggressivitetsforsøket ble gjennomført på hvetepanter av sorten Zebra i veksthus. Småaks ble inokulert med sporesuspensjon bestående av om lag 1000 konidier. Antall angrepne småaks ble registrert 18 dager etter inokulering.

Vekstrategiforsøket ble gjort i mørke ved temperaturene 10°C, 15°C, 20°C og 25°C. Forsøket ble gjennomført på PDA (Potato dextrose agar), og radial vekst i mm per døgn ble regnet ut for de forskjellige isolatene.

I forsøket med produksjon av perithecier var formålet å se evnen til de forskjellige isolatene til å danne perithecer. Forsøket ble gjennomført på 15°C, 20°C og 25°C under hvitt og NUV lys. Soppen ble dyrket på gulrotagar, og for å framprovosere dannelsen av perithecier ble mycelet skrapet bort når det hadde vokst ut til kanten av skåla. Forekomst av perithecier ble registrert etter en skjønnsmessig vurdering.

Det ble funnet at isolater av "ny" genotype var signifikant mer aggressive og signifikant mer saktevoksende enn isolatene av "gammel" genotype. Det ble ikke funnet noen

signifikante forskjeller i perithecieforsøket. Alle isolater dannet perithecier ved alle temperaturer, og alle, med unntak av ett, produserte ascosporer.

Ut fra disse funnene er det derfor trolig at soppens egenskaper har endret seg og derfor kan være en av årsakene til økt forekomst av *F. graminearum*.

Abstract:

Fusarium graminearum is an increasing problem in cereal production in Norway and large parts of the world. It is problematic due to loss in yields and particularly the production of mycotoxins caused by the fungus. There is probably a lot of reasons for this; climate changes has given the fungus better conditions, more use of conservation tillage and possible changes in the properties of the fungus population.

In this thesis it was looked upon if one of the reasons for the increased occurrence of *F. graminearum* is changes in the properties of the fungus. Aggressiveness, growth rate and production of perithecia was studied in 22 single spore isolates gathered from grain samples in Norway. These were chosen based on time of sampling and how they were related based on an AFLP-survey. The categories were old isolates, new closely related with old and new isolates not related to old isolates. These were parted into two groups, "old" and "new" genotype.

The growth rate experiments were conducted in darkness at the temperatures 10°C, 15°C, 20°C and 25°C. The fungus was grown on PDA (Potato dextrose agar), and radial growth in mm per day was calculated.

In the experiment with production of perithecia the goal was to look at the ability of producing perithecia for the different isolates. The experiment was conducted at 15°C, 20°C and 25°C under white and near ultraviolet light. The fungus was grown on carrot agar and the mycelium was scraped off the surface of the agar when it reached the edge

of the dish to promote the development of perithecia. The occurrence of perithecia was registered by a visual inspection.

Isolates of the "new" genotype was significant more aggressive and growing significantly slower than the isolates of "old" genotype. In the experiment with production of perithecia it was not found any significant differences.

Out of this survey it's reason to believe that the properties of the fungus has changed and thus be the reason of increased occurrence of *F. graminearum*.

Forkortelser:

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism.

DAI - Days After Inoculation (dager etter inokulering).

DON - Deoxynivalenol.

SKP - Senter for Klimaregulert Planteforskning.

MBA - Mung bean agar.

NIV - Nivalenol.

NUV - Nær Ultrafiolett lys.

PDA - Potato dextrose agar.

SNA - Spezieller Nährstoffarmer Agar.

ZEA - Zearalenon.

3-ADON - 3-acetyldeoxynivalenol.

15-ADON - 15-acetyldeoxynivalenol.

Kapittel 1 - Innledning

Bakgrunn:

Aksfusariose er en soppsykdom som rammer kornartene, mais og gras. Sykdommen kan forårsakes av en rekke arter innen soppselekten *Fusarium*. Angrep kan føre til redusert avling, lavere spireprosent, og soppen kan produsere en rekke forskjellige mykotoksiner som gjør kornet skadelig for mennesker og dyr. Sykdommen kan angripe røtter, nederste del av strået, fotsjuka ved spiring eller i akset (aksfusariose). Det mest alvorlige problemet er aksfusariose, fordi dette kan gjøre kornet uegnet til føde for dyr eller mennesker ved produksjon av mykotoksiner.

Skadevirkningene kan være mange og kan variere for de forskjellige mykotoksinene. Kartlegging av dette har kommet mye lengre for dyr enn for mennesker, men mange av dem kan antas å være like. Noen skadevirkninger kan være forgiftning, oppkast, diaré, fôrvegring, problemer med reproduksjon, veksttap, skader på lever og hjerne, hormonforstyrrelser og kreft. En-magede dyr er mer følsomme enn drøvtyggere mot disse (Eriksen and Alexander 1998).

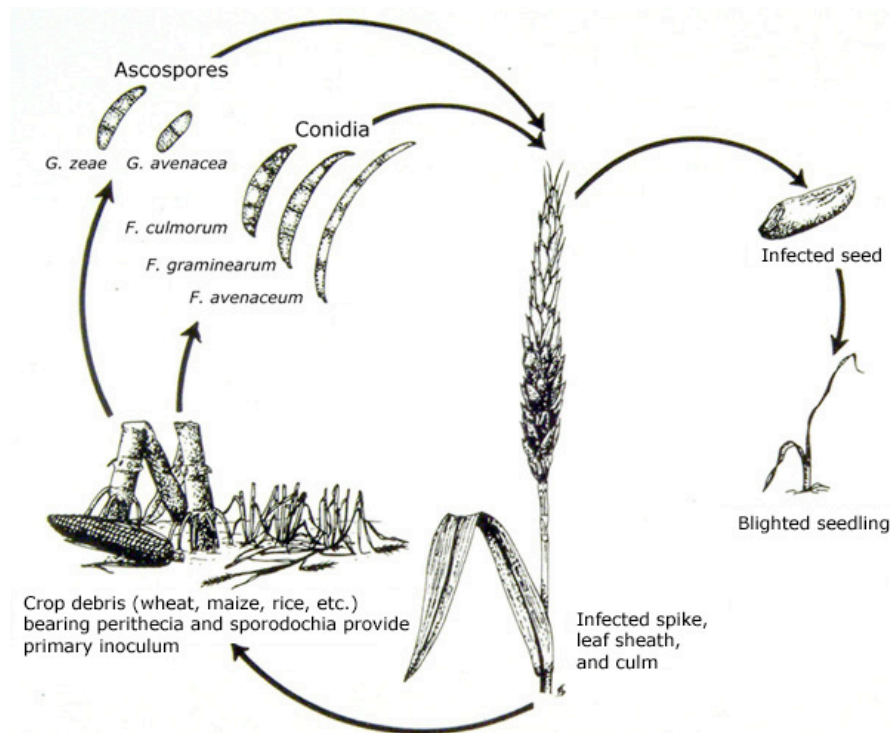
EU kom i 2006 ut med egne anbefalinger om hvordan man kan redusere eller unngå fusariumtoksiner i korn og kornprodukter (COMMUNITIES 2006). I Norge har vi grenseverdier for innhold av enkelte mykotoksiner. Disse er utarbeidet av Mattilsynet med grunnlag i EUs anbefalinger. Korn med for høyt innhold av mykotoksiner må enten kasseres eller blandes med friskt korn for å få toksininnholdet ned på akseptabelt nivå.

I USA kan avlingstapet som følge av aksfusariose komme opp mot 50% (Agrios 2005) og kan derfor ha stor økonomisk betydning. På verdensbasis legges det ned stor innsats på å finne mikroorganismer som kan brukes i biologisk kontroll mot *Fusarium*. Innen planteforedling jobbes det for å få fram resistente sorter (Agrios 2005; Xu, Nicholson et al. 2008).

Inokulum kan overvintre saprofyttisk på planterester på jordoverflaten eller på såfrø. Inokulum vil også kunne overleve selv om dette er begravd ved for eksempel jordarbeiding, men har ikke evnen til å produsere sporer (Khonga and Sutton 1988). Smittestoff som overvintrer på plantemateriale kan spres som konidier, ascosporer (perithecier) eller som deler av mycel. Ascosporer og konidier anses som de største kildene av inokulum. Spredning skjer ved spruting når det regner eller med vind (Paul, El-Allaf et al. 2004). Når peritheciene blir våte ved regn, vil ascosporene komme ut sammen med et geleaktig stoff. Når det igjen tørker opp, vil disse da kunne spres med vinden (Parry, Jenkinson et al. 1995).

Aksfusariose vil ha best vilkår for å utvikle seg hvis det er fuktig vær og regn ved og omkring blomstring, og det er på dette tidspunktet plantene er mest mottagelige (Paul, Lipps et al. 2007). Sporer som lander på aksene vil spire og angripe de forskjellige delene. Denne første infeksjonen vi komme fra overvintrende inokulum. Sekundære infeksjoner kan komme fra luftbårne konidier. Sekundær produksjon av ascosporer kommer vanligvis for sent til å utgjøre noen særlige problemer (Wiese 1987).

Angrepne aks kan få forskjellige symptomer. Infeksjonen kan ofte først sees som små vanntrukne brune flekker på forskjellige deler av akset. Denne infeksjonen vil spre seg i alle retninger fra infeksjonspunktet. Noen ganger kan en også se lakserosa eller rød soppvekst langs kanten av ytteragnene eller ved basis av småaksene. Infiserte korn skrumper inn og blir gråbrune, og aksene kan også tvangsmodnes og blekes. Ved lengre perioder med fuktig vær, vil tidlig smittede aks kunne få sporehoper med perithecier (Wiese 1987; Parry, Jenkinson et al. 1995; Agrios 2005). Korn som er infisert med *F. graminearum* vil få en redusert kvalitet fordi soppen ødelegger stivelseskorne, lagringsproteiner og cellevegger. Dette fører til dårligere spiringsevne og vigør (Parry, Jenkinson et al. 1995).



Figur 1: Livssyklus for aksfusariose (*Fusarium* Head Blight). (Schilder & Bergstrom 1993)

Forekomsten av de forskjellige *Fusarium*-artene er etter alt å dømme klimaavhengig. I kjølig og fuktig klima er *F. culmorum* og *F. avenaceum* mest utbredt, mens i varmt og tørt klima vil en finne mest *F. poae*. *F. graminearum* er mest utbredt i områder med varmt og fuktig klima (Xu, Nicholson et al. 2008). I Norge har *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. tricinctum* og *F. culmorum* tidligere vært de mest fremtredende (Kosiak, Torp et al. 2003; Henriksen and Elen 2005). I de seneste årene har derimot forekomsten av *Fusarium graminearum* øket i hele Nord-Europa, særlig på bekostning av *F. culmorum* (Parry, Jenkinson et al. 1995; Waalwijk, Kastelein et al. 2003; Xu, Nicholson et al. 2008).

Det er registrert stor variasjon mellom mottageligheten for aksfusariose hos forskjellige sorter av hvete. Den kinesiske sorten Sumai 3 og dens etterkommere har den sterkeste resistensen som er kjent mot aksfusariose. Kartlegging har blitt gjennomført for å finne gener som påvirker dette (Bai and Shaner 2004). Flere typer av resistens er beskrevet (Xu and Nicholson 2009). Type 1 er resistens som hindrer infeksjon, type 2 hindrer spredningen av soppen i akset (Schroeder HW 1963), type 3 er evne til å bryte ned mykotoksinet DON (Deoxynivalenol) (Miller and Arnison 1986) og type 4 er toleranse mot DON (Wang and Miller 1988). I tillegg til dette er også en del morfologiske

egenskaper avgjørende for resistens av en mer passiv karakter. Dette kan være ting som hvor tett småaksene sitter, utstøting av pollenknappene, høyde på bestand og tid for blomstring.

Vekstsesongen for planter regnes å begynne når jordtemperaturen om våren er over 5°C. For lufttemperaturen er dette når gjennomsnittstemperaturen i løpet av fem dager er over 5°C. Trond Rafoss ved Bioforsk har samlet data fra Bioforsks værstasjoner for å se på trender i løpet av de siste 16 årene. Han brukte verdiene for temperatur i luft i 2 meters høyde og i jord ved 10 og 20 centimeters dybde. Resultatet han kom fram til var at vekstsesongstart var blitt henholdsvis 30, 20 og 16 dager tidligere i løpet av denne perioden i henhold til de tre temperaturparameterene (Rafoss 2009). Med økt vekstsesong for planter må det også antas at vekstvilkårene for sopper slik som *Fusarium* også må ha blitt bedret.

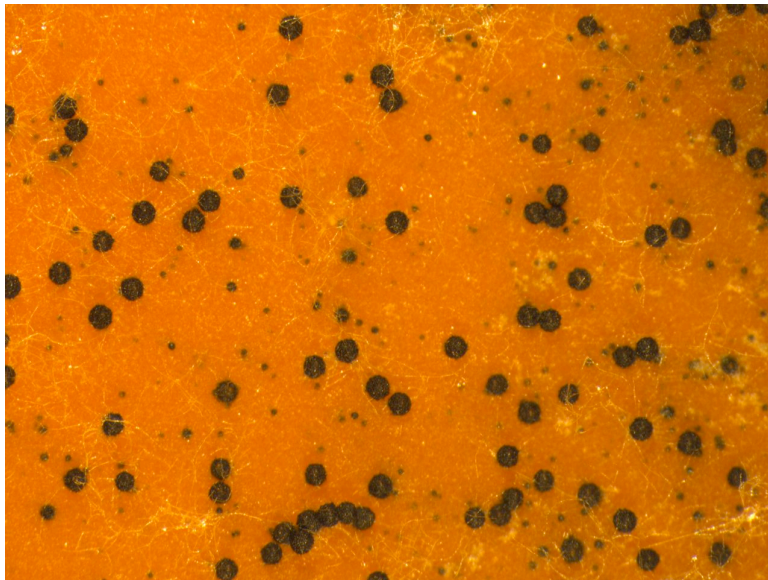
Fusarium graminearum

Fusarium er det ukjønnete stadiet av ulike arter innen rekken sekksporesopper (*Ascomycota*) og familien *Nectriaceae*. *Fusarium graminearum* er det anamorfe stadiet av soppen *Gibberella zeae*. *G. zeae* er homotallisk og vil i de fleste tilfeller kunne produsere perithecier uten å krysses med andre isolater (Leslie and Summerell 2006). *F. graminearum* ble tidligere kalt *F. graminearum* gruppe 2 for å skille den fra den heterotalliske gruppe 1. Denne har nå fått navnet *F. pseudograminearum*, med teleomorft stadium *Gibberella coronicola* etter at det i 1999 ble gjort molekylære og morfologiske tester for å kunne skille disse fra hverandre (Aoki and O'Donnell 1999). Makrokonidiene til *F. graminearum* er sigdformet og er 2,5-5 x 35-62 µm store (figur 2). De har fra 3-7 septa. Perithecier vokser på overflaten av strå og agner, og ofte i klynger (figur 3). Fargen er fra mørk lilla til svart. De er eggeformet og vokser som en liten utvekst. Størrelsen er 150-350 µm i diameter. Nedre temperaturgrense for produksjon av perithecier er 7-10°C (Wang 1997). Dufault fant at perithecier dannes og modnes mellom 12 og 28°C (Dufault, De Wolf et al. 2006). Asciene er klubbformet, 8-11 x 17-25

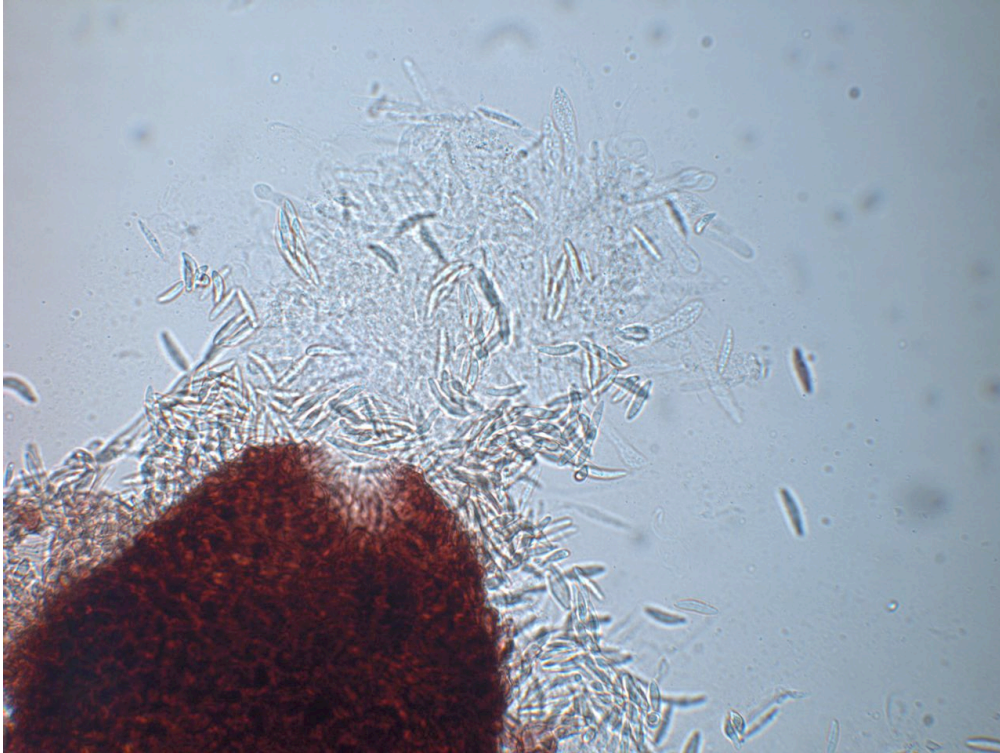
μm og inneholder 8 gjennomsiktige sporer. Ascosporene har 0-3 septa, vanligvis 3, og er 3-5 x 17-25 μm . (Wiese 1987) (figur 4).



Figur 2: Konidier av *Fusarium graminearum*. (Foto: J. Razzaghian 2010)



Figur 3: Perithecier av *Fusarium graminearum*/*Gibberella zeae* på gulrotagar. (Foto: G.B. Larsen 2010)



Figur 4: Ascosporer og asci av *Fusarium graminearum*/*Gibberella zeae*. (Foto: G.B Larsen 2010)

Isolater av *Fusarium graminearum* kan produsere tre viktige typer mykotoksiner, Zearalenone (ZEA), Nivalenol (NIV) og Deoxynivalenol (DON) (Leslie and Summerell 2006). Av disse er DON den vanligst forekommende og det største problemet i norsk produsert korn. Denne har også to acetylerede derivater 3ADON (3-acetyldeoxynivalenol) og 15ADON (15-acetyldeoxynivalenol). Disse forekommer oftest i små mengder, men er ganske giftige. Kjemotypen 15ADON er ansett å være den dominerende i Sør Europa, Nord Amerika og Kina, mens det er observert en økning i forekomstene av 3ADON flere steder i Nord Amerika (Tamburic-Ilincic, Gaba et al. 2008). 3ADON er den mest utbredte i Skandinavia, Finland og nordvestre Russland (Yli-Mattila 2010).

Mykotoksiner er sekundære metabolitter som produseres av soppen, og produksjonene av disse koster antagelig mye for soppen. Den primære rollen for mykotoksinene anses å være relatert til konkurranse med andre sopper og bakterier (Xu and Nicholson 2009). Mye tyder på at mykotoksiner ikke spiller noen viktig rolle for soppens evne til å angripe plantene. Bai et al. fant at DON spiller en signifikant rolle for spredningen av soppen i akset, men er ikke nødvendig for selve infeksjon (Bai, Desjardins et al. 2002). Jansen et

al. fikk de samme resultatene ved forsøk i hvete. For bygg var det derimot ingen sammenheng mellom produksjon av DON og spredning i akset (Jansen, von Wettstein et al. 2005). DON anses derfor å være en virulensfaktor i hvete, men ikke i bygg. Wanyoike et al. fant signifikant sammenheng mellom angrep av aksfusariose og DON innhold i høsthvete (Wanyoike, Walker et al. 2002).

I 2004 ble det registrert problemer med lav spireprosent hos havre. Analyseresultater fra KIMEN såvarelaboratorium viste at dette skyldtes stor forekomst av *F. graminearum*. I 2007 ble det registrert funn av *F. graminearum* i nesten 80% av de prøvene med vårhvete som ble analysert på KIMEN. Dette var en kraftig økning i forhold til årene 2005 og 2006 hvor 40-50% av prøvene ga funn. Det er også økning av funnene av mykotoksinet DON i kornprøvene, særlig hos havre (Aamodt 2008).

Den registrerte økningen har trolig flere forklaringer. Vi har hatt en klimaendring som har ført til mer varmt og fuktig vær, noe som vil være fordelaktig for soppen. Det har også blitt mer dyrking av sorter som er mottagelige for angrep av *F. graminearum* (Xu, Parry et al. 2005). Det er også økning av dyrking av mais i vekstskifte med hvete i store deler av Europa (Srobarova, Moretti et al. 2002). Studier utført i USA har vist at *Fusarium graminearum* også kan angripe og gi *Fusarium*-råte hos potet (Delgado, Schwarz et al. 2010). Sprøyting mot andre soppsykdommer kan også påvirke forekomsten av *Fusarium* spp. (Henriksen and Elen 2005). I Norge finnes det kun et godkjent middel som har god effekt mot *Fusarium*. Dette har handelsnavnet Proline og protiokonazol som virksomt stoff. Forsøk gjennomført i 2006 og 2007 ga om lag halvering av innholdet DON hos hvete og havre ved sprøyting med Proline under blomstring. Det er imidlertid viktig å treffe med dette tidspunktet for å oppnå god effekt (Elen 2009).

Økt bruk av redusert jordarbeiding i kombinasjonen med ensidig kornproduksjon vil gi et øket smittepress av *Fusarium* (Schaafsma, Tamburic-Ilincic et al. 2005). Av hensyn til miljø og økonomi har bruken av redusert jordarbeiding øket kraftig i hele verden de siste tiårene. Dette vil si at det ikke brukes en tradisjonell veltefjølsplog ved jordarbeidingen. Planterester fra forrige avling blir derfor liggende på jordoverflaten. Dill-Macky og Jones fant at angrep av aksfusariose i hvete ble redusert når det ble pløyd

etter hvete og mais sammenlignet med ingen eller redusert jordarbeiding (Dill-Macky and Jones 2000). Men ascosporer kan også spres over lange avstander med vind, så inokulum kan derfor også komme fra omkringliggende åkre.

Bioforsk Plantehelse fikk i 2006 innvilget et prosjekt ("Fusariumprosjektet") med hovedmålsetning å kartlegge faktorer som kan ha betydning for utviklingen av mykotoksiner i norskprodusert korn. Det skulle også arbeides med å komme fram til gode metoder for å identifisere kornpartier med høyt innhold av mykotoksiner. Slike analysemetoder må være raske, enkle i bruk, sikre og billige slik at de enkelt kan tas i bruk på kornmottakene. I tillegg skulle man utvikle modeller for å vurdere risiko for infeksjon. Ved bruk av modeller for estimering av risiko for infeksjon i forskjellige områder, vil en kunne få en mer målrettet prøveuttagning. Ved at man tar prøver fra de områdene hvor risiko for *Fusarium*-angrep er størst, vil sannsynligheten øke for at man identifiserer de partiene som har et høyt innhold av mykotoksiner.

De økte *Fusarium*-problemene i senere år kan også tenkes å skyldes endringer i egenskapene til de arter og stammer man finner i felt, sammenlignet med 10-20 år tilbake. I en studie utført av Ma et al. fant de fram til at aseksuelle arter innenfor *Fusarium*-slekten har evne til å utveksle relativt store mengder gener som kan gjøre isolater som tidligere ikke har gjort skade til vertsspesifikke patogener. Det samme gjelder med utveksling av gener som gjelder klimatilpasninger (Ma, van der Does et al. 2010). Dette vil derfor si at *Fusarium* kan endre egenskaper meget hurtig. Ved kontrollert inokulering ble det funnet at *F. graminearum* var mest aggressiv sammenlignet med *F. avenaceum*, *F. culmorum* og *F. poae* (Xu, Monger et al. 2007). Det er derfor sannsynlig at denne oppnår mer suksess hvis forholdene ligger til rette.

Behovet for kunnskap om eventuelle endringer i egenskapene som er viktige for vekst, sykdomsangrep, overlevelse og formering i soppulasjonene gjennom tid, har derfor vært bakgrunnen for denne oppgaven.

Målsetting med oppgaven

Hypotesen som ligger til grunn for denne oppgaven er at forekomsten og utbredelsen av *Fusarium graminearum* har økt kraftig de siste ti årene, og at dette skyldes at sopp-populasjonens egenskaper har endret seg.

Målsettingen var å kartlegge egenskapene aggressivitet, vekstrate og perithecieproduksjon for 22 isolater av *Fusarium graminearum*, for deretter å bruke resultatene fra disse forsøkene til å sammenligne isolater av "gammel" genotype med de med "ny" genotype for å se om det har skjedd noen forandring i egenskapene deres.

Vekstrate

Siden forekomsten av *F. graminearum* har økt de siste årene kan det antas at veksthastigheten har øket slik at nye isolater vokser raskere enn gamle isolater.

Vekstrate angir soppens veksthastighet *in vitro*. For å finne ut om nye isolater vokser raskere enn gamle, ble veksthastighet for 22 isolater målt ved temperaturene 10°C, 15°C, 20°C og 25°C ved dyrkning *in vitro* på PDA (Potato dextrose agar).

Aggressivitet

En av årsakene til økt problem med *Fusarium* og mykotoksiner i kornproduksjon kan skyldes at soppen har fått økt evne til å angripe planter, en økning i patogenitet eller aggressivitet. Hypotesen som ligger til grunn for disse studiene er derfor at isolater av "ny" genotype er mer aggressive enn isolater av "gammel" genotype.

Aggressiviteten til 22 isolater av *F. graminearum* ble derfor undersøkt ved at soppisolatene ble inokulert på hvetepanter av sorten Zebra.

Perithecieproduksjon

F. graminearum har de siste årene blitt den dominerende årsaken til aksfusariose. Denne arten har evne til å danne perithecier som er det teliomorfe stadiet til soppen, som da har navn *Gibberella zeae*. Disse står for produksjonen av asci og ascosporer. *Fusarium graminearum* er homotallisk og har derfor evne til å produsere dette uten å krysses med andre isolat. Formålet med forsøket var å karakterisere de ulike isolatenes evne til å danne perithecier. Evnen til å danne perithecier hos norske isolat av *F. graminearum* har aldri tidligere blitt undersøkt, og en mulig årsak til økt forekomst av *F. graminearum* kan skyldes nye isolat som har en bedre evne til å danne perithecier enn de isolatene som forekom for over 10 år siden.

For å teste denne hypotesen ble evne til perithecie dannelse og ascosporeproduksjon undersøkt hos *F. graminearum* isolat av "gammel" og "ny" genotype ved 3 ulike temperaturer (15°C, 20°C og 25°C).

Sammenheng mellom de ulike egenskapene hos de 22 isolatene av *F. graminearum*

Et av formålene med forsøkene var også å se om det var noen sammenheng mellom de forskjellige egenskapene som var studert. Både aggressivitet og vekstrate ga signifikante forskjeller mellom de to genotypene. Perithecieproduksjon ble også sammenlignet opp mot de andre egenskapene for å se om det var noen sammenhenger her.

Kapittel 2 - Materialer og Metode

Isolater av *Fusarium graminearum*

Isolater var samlet inn i sammenheng med et prosjekt på Bioforsk Plantehelse.

Det ble brukt 22 enkeltsporeisolater av *F. graminearum* som går inn i denne oppgava (Tabell 1). Disse ble valgt ut fra et totalt antall på 110 isolater.

Isolat navn	År	Stedsnavn	Isolert fra	Isolert av	AFLP gruppe	Chemotype	Genotype
023/2007	2004	Vestfold	Havre	Bioforsk1		3ADON	Ny
025/2007	2006	Hedmark	Hvete	Bioforsk1		15ADON	Ny
028/2008	2004	Akershus	Hvete	Bioforsk2	a	3ADON	Gammel
029/2007	2006	Hedmark	Hvete	Bioforsk1		3ADON	Ny
033/2008	1995	Hedmark	Havre	Bioforsk4	d	3ADON	Gammel
034/2008	1995	Akershus	Havre	Bioforsk5	a	3ADON	Gammel
038/2008	1998	Østfold	Havre	Vet inst	c	3ADON	Gammel
039/2008	1998	Østlandet	Havre	Vet inst	a	3ADON	Gammel
047/2007	2006	Hedmark	Hvete	Bioforsk1	b	3ADON	Gammel
058/2008	1995	Østfold	Havre	Vet inst	d	3ADON	Gammel
059/2007	2006	Akershus	Hvete	Bioforsk1	c	3ADON	Gammel
061/2007	2006	Hedmark	Hvete	Bioforsk1	d	3ADON	Gammel
063/2007	2006	Vestfold	Hvete	Bioforsk1		15ADON	Ny
066/2008	1995	Østfold	Havre	Vet inst	b	3ADON	Gammel
067/2007	2006	Hedmark	Hvete	Bioforsk1	e	3ADON	Gammel
077/2007	2006	Hedmark	Havre	Bioforsk1		3ADON	Ny
081/2007	2006	Østfold	Hvete	Bioforsk1		15ADON	Ny
087/2008	2007	Hedmark	Havre	Bioforsk2		3ADON	Ny
123/2008	1982	?	Ukjent	Bioforsk3	e	3ADON	Gammel
137/2008	2007	Akershus	Havre	Bioforsk		3ADON	Ny
139/2008	2007	Aust Agder	Havre	Bioforsk		15ADON	Ny
140/2008	2007	Vestfold	Havre	Bioforsk		3ADON	Ny

Tabell 1: Isolater *Fusarium graminearum* som er brukt i forsøkene i denne oppgaven.

Bioforsk₁: Aamodt H.U. & Hofgaard I.S.

Bioforsk₂: Razzaghian J.

Bioforsk₃: Haave R.

Bioforsk₄: Henriksen B.

Vet inst: Veterinærinstituttet

Av de 110 isolatene ble også noen isolater fra Finland, Russland, Tyskland og USA tatt med for sammenligning (Aamodt 2008), men disse er ikke brukt her i denne oppgaven.

De norske isolatene i forsøket er isolert fra kornprøver samlet inn av Bioforsk og

Veterinærinstituttet. De er kartlagt med AFLP (Amplified Fragment Length

Polymorphism PCR) for å finne genetisk variasjon (Aamodt, pers med) (Vedlegg 2).

AFLP-gruppene i tabell 1 viser hvilke av isolatene som er beslektet med hverandre, og disse har her samme bokstav. Etter AFLP kartlegging ble isolatene plassert i to ulike kategorier, "ny" og "gammel" (Tabell 1) ut fra plassering i dendogrammet og tidspunkt for funn av genotype.

Fem av de utvalgte isolatene ble isolert på midten av 2000-tallet, og disse var plassert i AFLP dendogrammet nært 7 av de gamle isolatene fra 90-tallet, noe som viser at de har lignende genotyper. Disse til sammen 12 isolatene har derfor fått betegnelsen "gammel" genotype siden disse isolatene har en genotype som er lik eller tilnærmet lik de som er kjent fra tidligere. De 10 resterende isolatene var nye isolater fra 2000-tallet som ikke lå i nærheten av noen av de gamle isolatene som ble utvalgt i AFLP dendogrammet og derav ikke er i noen AFLP-gruppe. Disse isolatene blir derfor betegnet som "ny" genotype som ikke er funnet i kornprøvene tidligere. Av disse 10 "nye" isolatene, var fire antatte produsenter av kjemotypen 15ADON. Resten av isolatene i forsøket antas å produsere kjemotypen 3ADON. Hva de faktisk produseres er ennå ikke kjent, men dette skal undersøkes av Veterinærinstituttet.

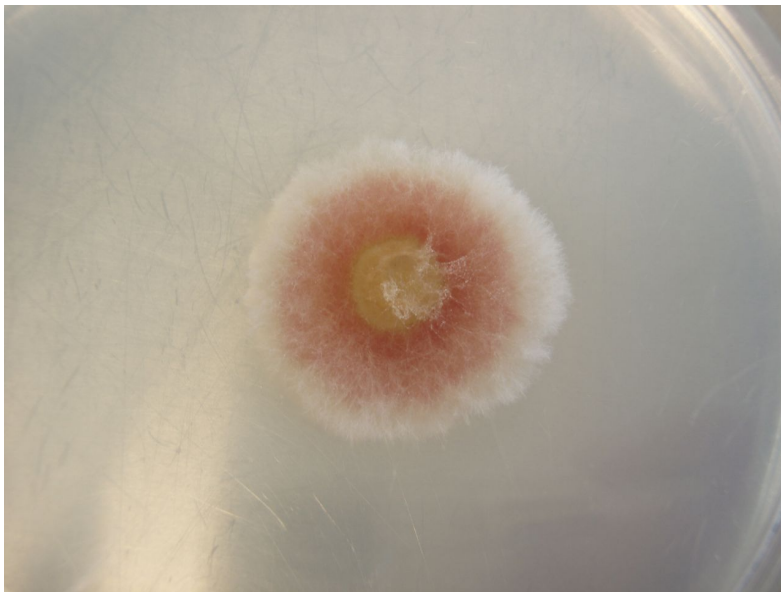
Isolatene som er benyttet ble valgt ut for å inkludere hele spekteret i AFLP dendogrammet og for å få med isolater som ble isolert på 1990-tallet og 2000-tallet. For de sistnevnte er det tatt med både isolater som har en genotype som ikke tidligere var kjent og genotyper som ligger nærme i de som er funnet på 90-tallet i AFLP dendogrammet. Det en kan se, er at mange av de nye isolatene funnet i Norge ligger nærme de utenlandske i dendogrammet.

Vekstrate

Mycel av de ulike isolatene var lagret ved -80°C på SNA-kjeks (Spezieller Nährstoffarmer Agar) (Vedlegg 1) i eppendorfrør med 20% glyserol. Disse ble tatt opp og overført til SNA-skåler som hver inneholdt tre biter autoklavert papir. Det viste seg at hos isolat 23/07, 29/07, 61/07 og 77/07 var agarpluggene løst opp slik at blandingen måtte overføres til SNA-skålene med pipette. For de øvrige isolatene var kjeksene intakte, og de ble lagt ut, en på hver skål. Skålene ble dyrket på 20°C under hvitt + NUV (nær ultraviolet) lys i skap med kjøleplater pakket inn i poser. I dette skapet blir nedkjølt

vann sirkulert i plata skålen står på, slik at temperaturen holdes jamn. Grunnet dårlig vekst ble isolatene 23/07 og 77/07 overført til nye SNA-skåler etter en uke.

Soppen ble dyrket i 17 dager på 90mm SNA skåler. Kjeks med en diameter på 5mm ble stanset ut fra ytterkant av vekstsonen, og fem kjeks fra hvert isolat ble lagt i hvert sitt eppendorfrør som hver inneholdt 20 µl 20% glyserol. Det ble laget 8 rør per isolat. Rørene ble frosset ned på -80°C.



Figur 5: Vekst av *Fusarium graminearum* isolater på Spezieller nährstoffarmer agar (SNA) for oppformering av mycel (isolat 77/07). (Foto: G.B. Larsen 2009)

Måling av vekstrate

I hvert forsøk ble de 22 isolatene av *F. graminearum* tatt opp som frosset mycel på SNA kjeks i 20% glyserol på -80°C. Et eppendorfrør for hvert isolat ble tatt opp og en kjeks ble overført til senter av hver sin skål med PDA (Potato dextrose agar, 90mm i diameter) for oppformering av isolater (Brennan, Fagan et al. 2003). Det ble benyttet 3 skåler pr isolat, til sammen 66 skåler per forsøk. Skålene ble plassert ved 20°C i mørke. Etter tre dager ble kulturrene overført til nye skåler ved at kjeks ble stanset ut fra det ytterste området av mycelveksten, og hvert isolat ble overført til 12 nye PDA-skåler, og disse ble forseglet med parafilm. De utstansede kjeksene hadde en diameter på 5mm. Tre skåler av hvert isolat ble plassert på henholdsvis 10°C, 15°C, 20°C og 25°C i mørke. For å

utjevne eventuelle variasjoner i skapene ble de 3 skålene for hvert isolat innen hver temperatur tilfeldig plassert i hylla. Skålene ved 15°C, 20°C og 25°C ble plassert i skap med kjøleplater, og isolater som skulle stå ved 10°C, ble plassert i et temperaturregulert skap. Når kjeksene hadde fått litt tid til å feste seg på den nye agaren, ble det tegnet opp et kryss på undersiden av skålene hvor agarkjeksene var sentrum. For 10°C og 15°C ble veksten merket av etter 1 og 7 dager etter poding (Brennan, Fagan et al. 2003). For 20°C og 25°C etter 1 og 3 dager.

Ved registrering ble det satt av merker med tusj på de kryssende strekene under skålene for ytterkanten av veksten til soppen. Alle registreringene ble gjort på samme tidspunkt alle dagene. Etter at registreringen var ferdig, ble merkene på skålene målt opp med linjal. Diameteren begge retninger for begge tidspunkter ble registrert. Hele forsøket ble gjentatt tre ganger.

Merkene som var satt av på skålene ble målt og notert. Det ble så regnet ut gjennomsnittlig vekst per dag. Dette ble målt ut fra vekstraten mellom første og andre registrering. På denne måten vil ikke eventuelle feilkilder omkring poding ha noen innvirkning. For temperaturene 10 og 15 °C ble det gjennomsnittsveksten for 6 dager og for 20 og 25°C for 2 dager. Enheten for tallene ble derfor "Radial vekst i mm per døgn".

Resultatene som ble lagt inn i Minitab var gjennomsnittlig radial vekst i mm per døgn for hvert isolat ved hver temperatur. Det ble gjennomført en variansanalyse av tallene (Vedlegg 4b).

På gjentak 3 ble det problemer med temperaturføleren i hylla med 25°C. Dette ble oppdaget da forsøket skulle avsluttes, og det var da uvisst hvor lenge problemet hadde vedvart. Reell temperatur i hylla lå et sted mellom 20 og 25°C. Tallene for tredje gjentak ved 25°C ble derfor fjernet fra datasettet.

Aggressivitet

Tillaging av inokulum

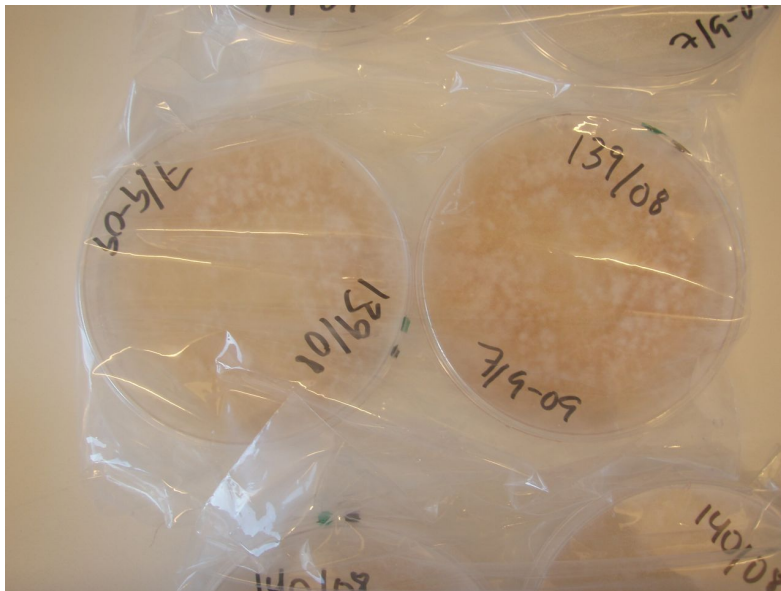
Metoden som ble brukt var å ta opp som mycel på SNA fra 80°C for så å pode til skåler med MBA (Mung bean agar). Disse skålene ble så vasket med destillert vann, og ønsket konsentrasjon med sporer ble overført til nye skåler med MBA. Disse skålene ble tilslutt også vasket med destillert vann, og inokulum ble laget for veksthusforsøket.

For tillaging av inokulum til aggressivitetstesten ble isolatene oppformert som beskrevet under materiale og metode for vekstrate. Alle isolatene ble overført fra SNA til MBA (Mung bean agar) skåler. Det ble benyttet tre skåler per isolat for oppformering av konidier, og disse ble satt ved 20°C. For å sikre at vi fant betingelser som ville gi god konidieproduksjon, ble to av skålene satt under NUV og hvitt lys ($\text{Ca } 50\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$), og en av skålene ble satt under NUV og litt redusert hvitt lys.

Produksjonen av konidier var dårligere enn forventet, og etter 10 dager ble det skåret spor på tvers av agaren i alle skålene, i håp om at dette skulle øke sporeproduksjonen. Temperaturen ble også satt opp til 23°C i skapet. Etter 14 dager var sporeproduksjonen hos isolatene 23/07, 33/08, 34/08, 87/08 og 137/08 fortsatt meget dårlig. Disse, og de isolatene i samme AFLP-gruppe (28/08, 39/08, 58/08, 61/07 og 77/08), ble derfor satt tilbake i skapet ved 23°C. Tolv av isolatene (25/07, 29/07, 47/07, 59/07, 63/07, 67/07, 81/07, 38/08, 66/08, 123/08, 139/08 og 140/08) ble samme dag overført til nye MBA skåler. Sporer ble vasket av fra skålene med 2,5 ml destillert vann ved hjelp av en pipette. Det ble også overført 2,5 ml vann til et rør for bruk hvis det var behov for mer vann. Behovet for mengde sporesuspensjonen var 2 ml. Sporesuspensjonen fra vasking ble ristet; 8 μl ble pipettert opp og overført til et Hycor Kova tellekammer. Ønsket konsentrasjon var 10^5 sporer pr ml (Bai, Plattner et al. 2001). Dette vil si ca 5,5 sporer pr smårute i tellekammeret. Fra 3 til 6 sporer pr rute ble akseptert. For å unngå spiring ble rørene med ferdige sporesuspensjonen satt i kjøleskap når de var klare. Da alle skålene var vasket, ble sporesuspensjon fra hvert isolat overført til to skåler MBA. På hver skål ble 1 ml sporeløsning fordelt utover skålen med en L-formet glasstav. Skålene

ble lagt i poser og plassert på 23°C med NUV og hvitt lys. Disse sto i skapet i 11 dager for produksjon av konidiesporer.

Grunnet den dårlige sporeproduksjon hos isolatene 23/07, 33/08, 34/08, 87/08 og 137/08 fikk og de resterende isolatene derfor stå i skapet ytterligere seks dager til. Disse fem og de resterende isolatene (28/08, 33/08, 34/08, 39/08, 58/08, 61/07, 77/08, 87/08 og 137/08) ble så vasket 20 dager etter poding og overført til nye MBA skåler. Grunnen til at disse ni isolatene ble stående sammen med de med dårlig sporeproduksjon, var fordi disse er nært beslektet, og det var ønskelig at disse fikk så lik behandling som mulig. Noen av isolatene var det vanskelig å få et tilstrekkelig antall sporer fra. For isolat 137/08 måtte sporene som var vasket av, sentrifugeres for å oppnå riktig konsentrasjon. Det ble sentrifugert på 3000 rpm i 10 minutter på 4°C. Fra isolat 23/07 lyktes det bare å få 1,5 sporer pr rute, fra 137/08 kun 2 sporer per rute og 33/08 bare litt over 1 spore pr rute. Men dette ble akseptert, og vi valgte å ikke sentrifugere disse.



Figur 6: Vekst av *Fusarium graminearum* på mung bean agar (MBA) for produksjon av inokulum til aggressivitetsforsøk (isolat 139/08). (Foto: G. B. Larsen 2009)

Høsting av sporer

Etter 11 dager vekst på MBA ved 23°C ble sporene vasket av skålene med 5 ml destillert vann og 200 µl av dette overført til et nytt eppendorfrør. Inokulumet skulle ha en konsentrasjon på 100.000 sporer per ml. Dette vil si ca 1,1 spore per smårute på tellekammeret (mellom 0.99 og 1.29 ble godtatt). Sporekonsentrasjonen ble målt og fortynnet ved behov. For hvert isolat ble det laget 3ml inokulum som ble frosset ned til -20°C i eppendorfrør à 1 ml.

Et av rørene for hvert isolat ble senere tatt opp fra fryseren og fordelt ut på skåler med vannagar, 0,5 ml på hver. Etter 6 timer ble sporespiring kontrollert ved telling i mikroskop (Leonard and Bushnell 2003). Spireprosenten lå mellom 60 og 100%. Det så også ut til at sentrifugeringen av isolat 137/08 ikke hadde hatt noen innvirkning på spiringen.

Isolatnavn	Spireprosent
023/07	90
025/08	74
028/08	80
029/07	77
033/08	65
034/08	85
038/08	92
039/08	80
047/07	98
058/08	60
059/07	90
061/08	90
063/07	100
066/08	85
067/07	95
077/07	85
081/07	90
087/08	95
123/08	70
137/08	85
139/08	85
140/08	61

Tabell 2: Spireprosent for konidier til inokulum etter 6 timer på vannagar.

Plantemateriale

Vårhvete (*Triticum aestivum*) av sorten Zebra ble dyrket i veksthus. Zebra er valgt fordi denne ikke skiller seg ut som verken meget mottagelig eller meget resistent mot *Fusarium graminearum*. I tillegg er det en mye dyrket sort i Norge. Frøene kom fra KIMEN såvarelaboratorium og var valgt ut på grunnlag av god spireprosent (>90%) og liten kontaminering med frøbårne patogener.

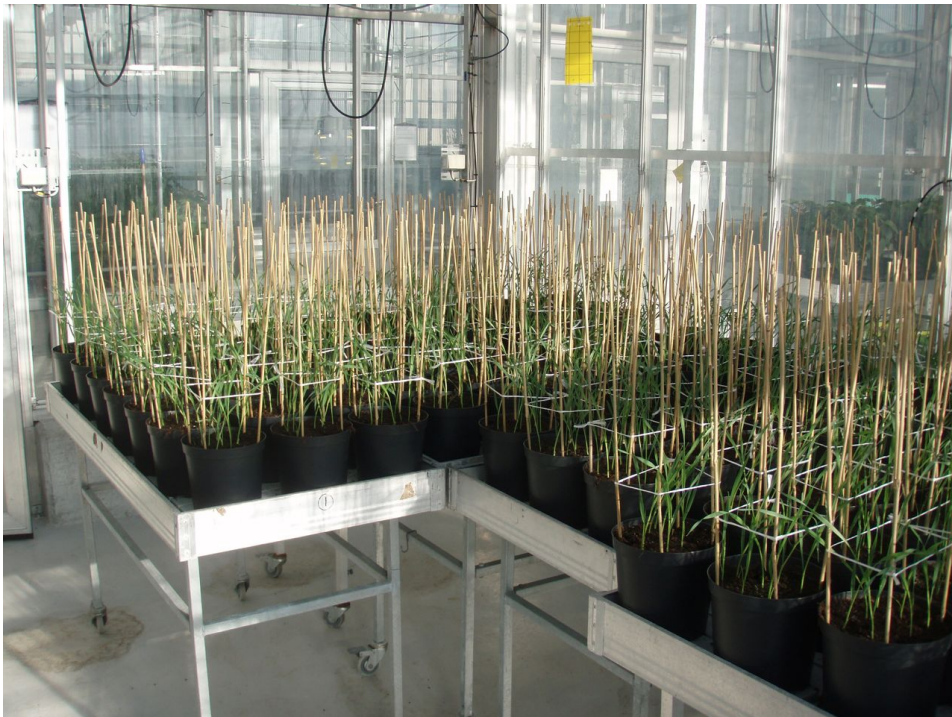
Plantene ble dyrket i potter med diameter på 19 cm i P-jord fra LOG. Denne består av 70 vol% sphagnumtorv H2-H4, 20 vol% sphagnumtorv H6-H8 og 10 vol% sand. Gjødseleinnhold er: N=950mg/l, P-cat= 40mg/l, K-cat= 180 mg/l. Det ble sådd 9 frø per potte som ble tynnet ut til 7 etter to uker. Til sammen ble det sådd 125 potter.

Forsøket ble gjennomført i et av SKPs vekstom i Åsbakken. Lyskilden som ble brukt var av typen Osram Powerstar HQ i-BT 400W/D. Siden plantene ble dyrket på høsten, var det behov for tilleggslys hele tiden, med unntak av fine dager. Målt lysmengde ved toppen av bestandet ble målt til mellom 150 og 200 $\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$. Lampene ble justert i høyden etter hvert som plantene vokste, for å holde en omtrentlig lik avstand mellom lamper og planter gjennom forsøket.

Fra såing og fram til aksskyting var ønsket dagtemperatur 15°C og nattemperatur 10°C. Grunnet lav utetemperatur gikk det bra å holde disse betingelsene. Det ble stilt inn til 16 timers dag, med lys på fra kl 04.00 til 20.00 og relativ luftfuktighet på 65%. Fra plantene var to uker gamle, ble det gjødselevannet en gang per uke. Gjødselevannet som ble brukt hadde ledetall på ca 1,5, og det ble gitt 5 dl per potte. I tillegg til dette ble det vannet ved behov, på det meste hver dag. Gjødselevannet bestod av en blanding 25 kg rød Superba (Yara) blandet i 200l vann og 25 kg kalksalpeter (Yara) blandet i 200l vann (Vedlegg 5). Når plantene begynte å strekke seg, ble de støttet opp. Til dette ble det brukt fire bambuspinner per potte som det ble bundet en tråd rundt. Dette ble gjort om lag to uker etter såing, samtidig med tynning. Tråden ble flyttet oppover i takt med veksten på planene.

Det ble oppdaget startende angrep av meldugg på plantene 5,5 uke etter såing. Det ble derfor sprøytet med Forbel 750 i en dose på 1ml pr liter vann (Vedlegg 3). Det totale forbruk var ca 1,5 liter, noe som tilsvarer omkring full dose.

Etter aksskyting, om lag 7 uker etter såing, ble lysperioden økt til 18 timer og dagtemperatur til 20°C og nattemperatur til 15°C. Relativ luftfuktighet ble satt opp til 75%.



Figur 7: Oppal av hvetepanter i veksthus for bruk til aggressivitetsforsøk. (Foto: G.B. Larsen 2009)

Inokulering

Pottene i veksthuset ble delt opp i 4 fire grupper dagen før inokulering. Dette var ca en uke etter skyting, ved begynnende blomstring. Målet var å få mest mulig jamne planter innad i hver gruppe. Plantene var ganske jamne fordi bordene var rullert rundt i rommet. Det var ikke nevneverdig forskjell på gruppene, bortsett fra at enkelte av pottene ikke hadde mer enn 6 aks som blomstret, disse ble likevel tatt med for å få nok potter. Til sammen 92 potter ble tatt ut for smitting. Dette tilsvarte en potte i hver av de fire gruppene for hvert av de 22 isolater, pluss kontroll. Pottene ble merket med nummer fra 401-492. Pottene ble plassert på rekke under vekstlyset hvor pottene i hver

gruppe sto sammen i tilfeldig rekkefølge. Hver gruppe ble plassert på 1,5 bord, til sammen 6 bord.

2 måneder etter såing ble plantene i veksthuset inokulert. Ferdig inokulum ble tatt opp fra fryser og plassert i isoporkasse med is. Rørene ble tatt opp etter hvert, slik at de smeltet i rett tid for bruk. Av hvert isolat var det to eppendorfrør med sporesuspensjon. Hvert rør inneholdt 1 ml løsning og ble brukt på to potter. Før smitting ble rørene ristet kraftig på en vortex. Før inokulering av potte nummer 2 ble resterende blanding i røret blandet ved å suge den ut og inn med pipetten. Pipetten som ble brukt var av merket Finnpipette med 0,5 ml tip. Hver dråpe fra denne er 10 μ l og tilsvarer ca 1000 sporer (Bai, Plattner et al. 2001). Det ble byttet spiss mellom hvert eppendorfrør. Fjerde småaks regnet fra toppen ble inokulert. En dråpe ble dryppet rett i blomsten ved at ytteragnene ble brettet ut til siden. Småakset rett over på samme side av akset ble merket med vannfast tusj. Hansker ble byttet mellom hvert isolat. Til kontroll ble det benyttet destillert vann. Etter smitting ble hver potte dekket med en plastpose fuktet med 6-7 sprut destillert vann fra spruteflaske (Muthomi, Oerke et al. 2002). Lyset var slått av i de 48 timene posene satt på.



Figur 8: Hvetepanter med fuktkammer etter inokulering med *Fusarium graminearum* i aggressivitetsforsøk. (Foto: G. B. Larsen 2009)

Grunnet tilbakevendende problemer med meldugg ble det besluttet å sette på svoveldamper i denne perioden for å forebygge angrepet noe. Svoveldamperen ble satt på to timer hver natt (Svovelblomme, 99,8%). Denne ble slått av når posene ble tatt av fordi vi var usikre på hvilken effekt den kunne ha på *Fusarium*. Når posene ble fjernet, ble også lyset slått på igjen.

Registrering av *F. graminearum* angrep i hvete

Antall smittede småaks ble registrert 11, 18 og 25 dager etter inokuleringen. Antall blekede småaks ble telt fra det inokulerte småakset og nedover. Gjennomsnittet av alle aksene i hver potte ble brukt for videre beregninger.

Grunnet økende melduggproblemer og fare for at denne skulle utvikle seg i akset, ble det på nytt sprøytet med full dose Forbel 750, 12 dager etter inokulering. Sprøytingen ble utført 6 dager før andre registrering.

Resultatene fra andre registrering er de som er blitt brukt. Ved tredje registrering var plantene og soppen kommet langt i utviklingen, og sammen med mjøldoggangrep ville det være kilder for feil i registreringene. Det ble utført en variansanalyse på tallene for å sammenligne angrep av "ny" og "gammel" genotype (Vedlegg 4a).

Peritecieproduksjon

Dyrking av sopp for produksjon av perithecier

Isolatene ble oppformert som beskrevet under materiale og metode for vekstrate. I forkant av forsøket ble det gjort noen innledende forsøk for å se hvordan potensialet var og hvor lang tid ting tok. Forskjellige behandlinger og metoder for skraping av mycel ble testet ut.

Soppmycel dyrket på SNA ble overført til skåler med gulrotagar (Vedlegg 1). Hvert isolat ble podet på 9 skåler. Disse ble satt i skap med kjøleplater på temperaturene 15°C, 20°C og 25°C (tre skåler ved hver temperatur). Skålene ble av praktiske årsaker lagt i poser med zi-plås slik at det skulle bli lettere å ta dem ut av skapet for å se på dem opp mot lyset. De ble så dyrket under hvitt lys med lysperiode på 16 timer (Gilbert, Woods et al. 2008). Når mycelet for de fleste av isolatene innad for hver temperatur hadde vokst ut til kanten av skåla, ble de skrapet. Dette ble gjort med et objektglass, og alt mycel på overflaten ble fjernet. Deretter ble 0,5 ml Tween 20 strøket ut over skåla med glasstav. Grunnet variasjon i veksthastighet var det noe ulikt hvor langt ut mot kanten av skåla mycelet hadde kommet. For enkelte var mycelet nådd kanten et par dager før skraping, men for andre var mycelet ennå ikke nådd helt ut. For de isolatene som ennå ikke var helt utvokst, ble det merket med tusj på lokket for å vise hvor langt ut veksten var. Skålene ble så satt tilbake i skapet, men nå også med NUV lys. Skålene på 25°C ble skrapet etter 6 dager etter poding, på 20°C etter 8 dager og på 15°C etter 14 dager. Det ble registrert at zi-plås posene medførte mye kondens i skålene, og de ble derfor tatt av 14 dager etter poding. I forhold til de innledende forsøkene som var gjennomført på forhånd, ble det mye mer mycelproduksjon. Særlig gjaldt dette skålene på 25°C.

Registrering av perithecieproduksjon

Perithecieproduksjonen i hver skål ble registrert skjønnsmessig etter en klassifisering i 4 kategorier. 0=ingen funn av perithecier ved siste registrering, 1=enkelte perithecier, 2=middels antall perithecier, 3=mange perithecier. Dette er vist på Figurene 20, 21 og 22. Tidspunktet for registrering ble valgt ut på grunnlag av hvordan det så ut med utviklingen av peritheciene i skålene. Registreringen av perithecieproduksjon for skålene som stod ved 25°C ble gjort 16 dager etter skraping av skålene, mens skålene som hadde stått ved 20 og 15 °C ble registrert etter hhv. 19 og 22 dager.

På mange av skålene ble registreringen vanskelig gjort av til dels mye mycelvekst. Fra undersiden av skålen kan en se mørke områder, men disse er ikke alltid perithecier. Dette gjaldt særlig skåler med kun liten produksjon av perithecier, oftest i kategori 0 eller 1. Det ble derfor nødvendig å skrape bort mycelet og studere kulturen under en

lupe for å finne forekomsten. På skåler med mer kraftig produksjon av perithecier kan en enkelt se det fra oversiden av skåla, siden mycelveksten oftest ikke er så kraftig der hvor peritheciene befinner seg.

Til slutt ble peritheciene lagt på objektglass og studert i mikroskop for å se på produksjonen av ascosporer. Det ble gjennomført variansanalyse i Minitab for å sammenligne evne til å produsere perithecier for isolater kategorisert som hhv. "ny" eller "gammel" genotype.

Kapittel 3 - Resultater

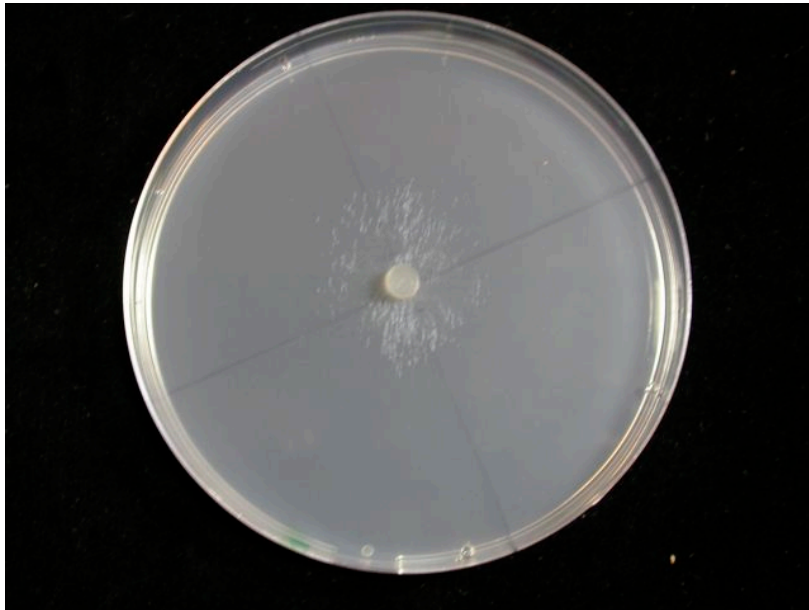
Vekstrate

Figurene 9 og 10 viser veksten hos to av isolatene. Isolat 29/07 har en mer typisk vekst og mycelproduksjon enn 137/08 som vokser mer som tynne tråder.

Ved 10°C var gjennomsnittlig radial vekst for de tre gjentakene 3,12mm per døgn. For 15°C var snittet 4,42mm , 20°C 8mm og 25°C 13,09mm. Se figur 17.



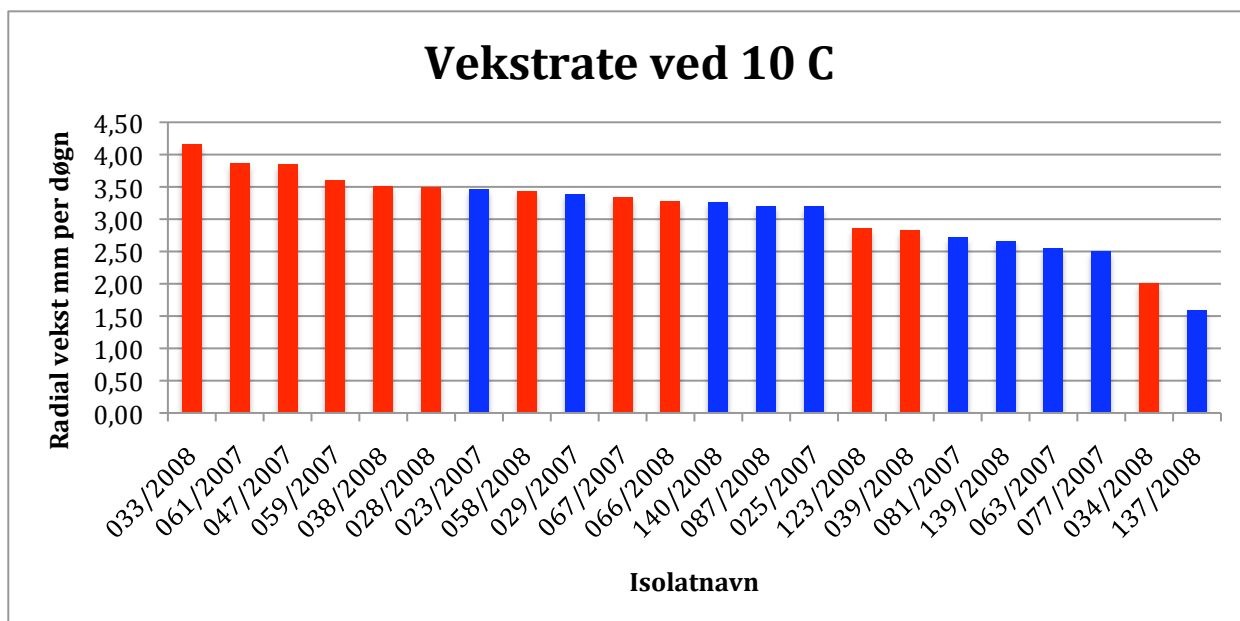
Figur 9: Dyrking av *Fusarium graminearum* på potato dextrose agar (PDA) for beregning av *in vitro* vekstrate (isolat 29/07). (Foto: G. B. Larsen 2010)



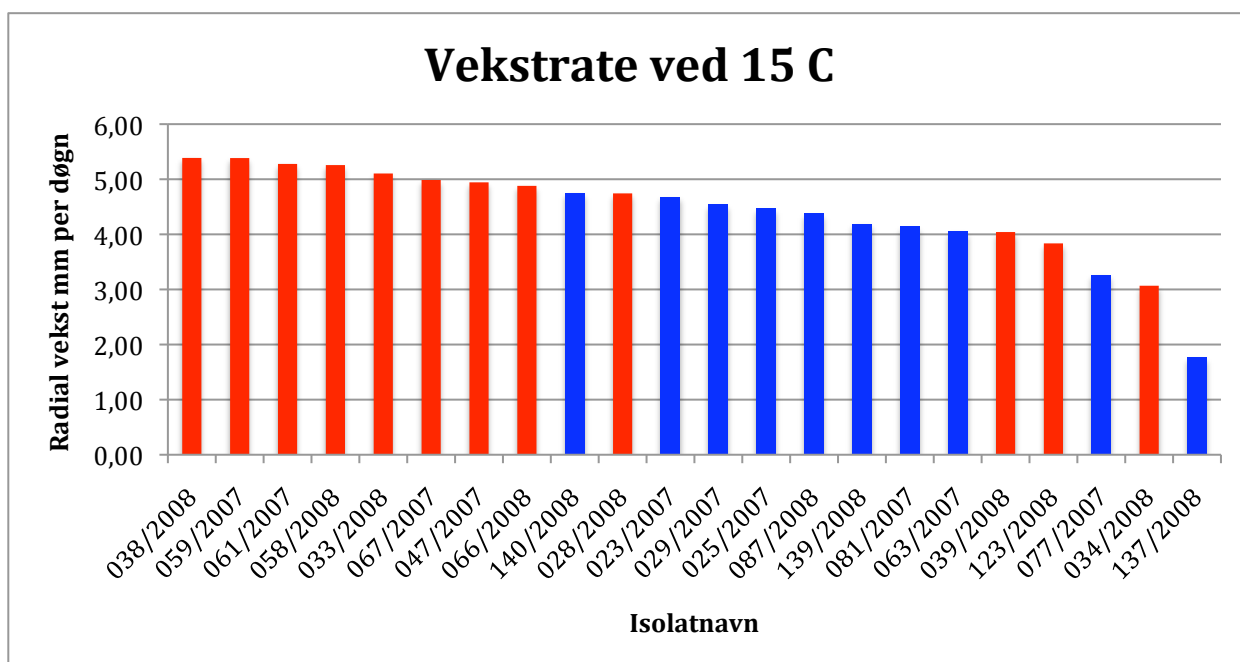
Figur 10: Vekst av *Fusarium graminearum* på potato dextrose agar (PDA) for målinga av radial vekst og *in vitro* vekstrate. Viser isolat 137/08 med atypisk trådmycelvekst. (Foto: G.B. Larsen 2009)

Videre viste variansanalysen at isolatene med "ny" genotype hadde signifikant lavere vekstrate enn de av "gammel" type (Vedlegg 4b).

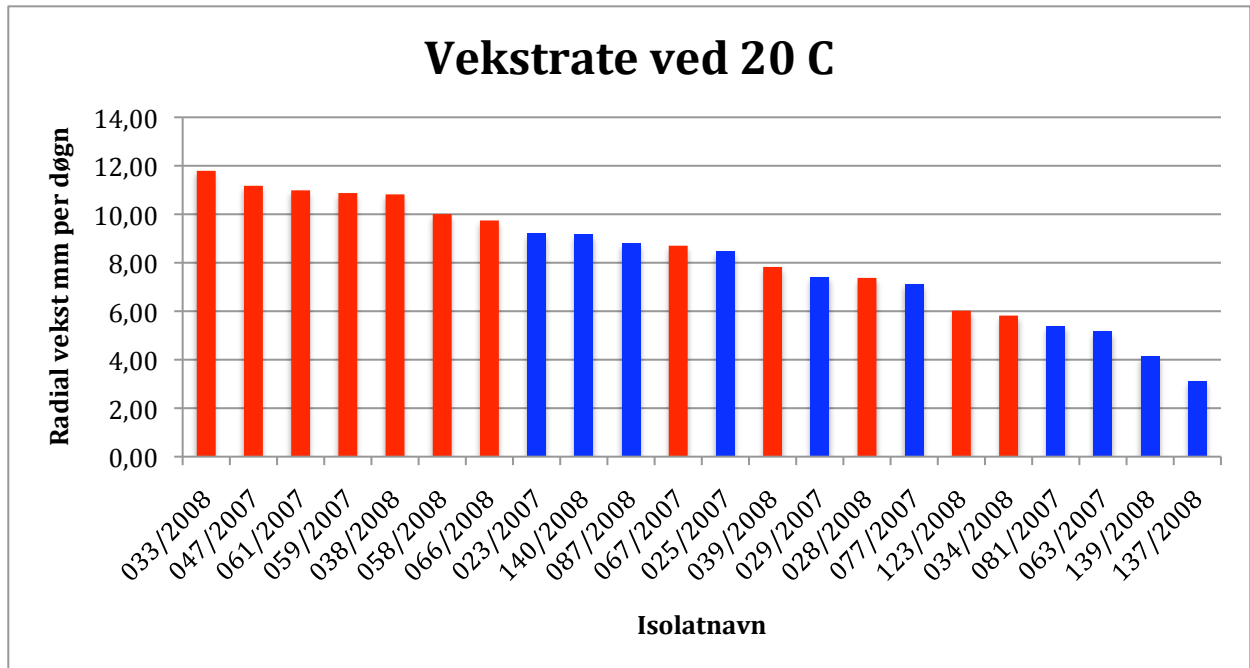
Figurene 11, 12, 13 og 14 viser vekstrate for de 22 isolatene *F. graminearum* ved temperaturene 10°C, 15°C, 20°C og 25°C. Isolater av "ny" genotype er farget blå, og isolater av "gammel" genotype er farget rødt.



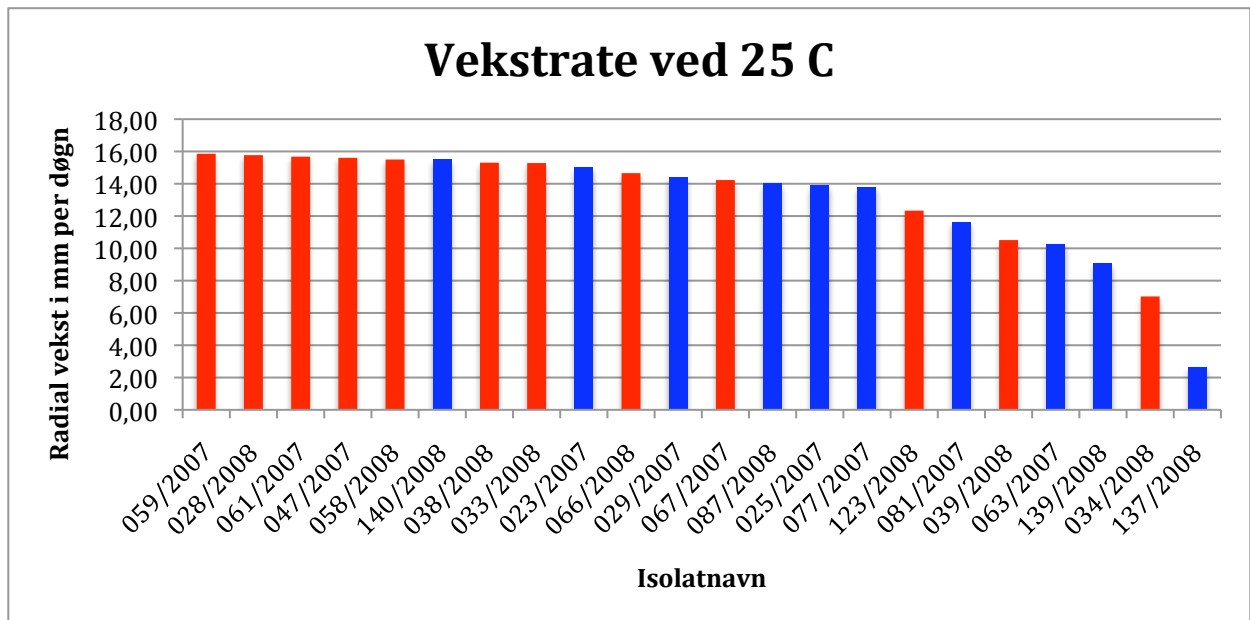
Figur 11: Vekstrate *in vitro* for 22 isolater *Fusarium graminearum* dyrket på potato dextrose agar (PDA) ved 10°C. Hver søyle er snitt av 3 gjentak (tre skåler av hvert isolat innen gjentak) (Rød: "gammel" genotype, blå: "ny" genotype.)



Figur 12: Vekstrate *in vitro* for 22 isolater *Fusarium graminearum* dyrket på potato dextrose agar (PDA) ved 15°C. Hver søyle er snitt av 3 gjentak (tre skåler av hvert isolat innen gjentak). (Rød: "gammel" genotype, blå: "ny" genotype.)

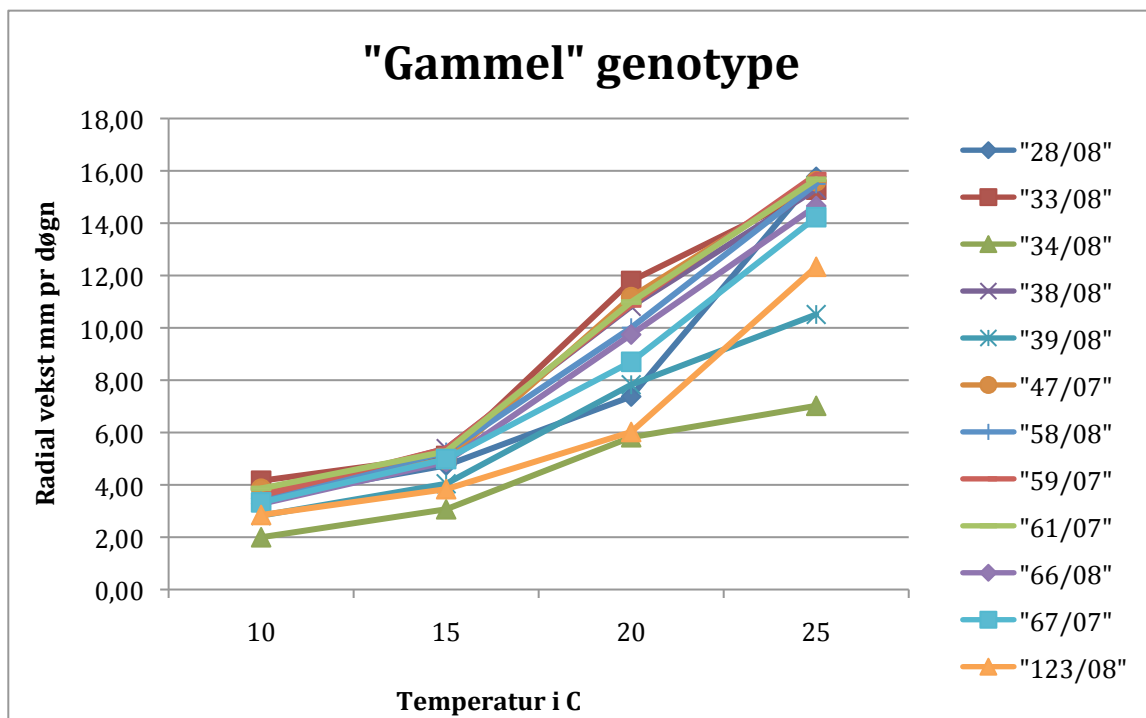


Figur 13: Vekstrate *in vitro* for 22 isolater *Fusarium graminearum* dyrket på potato dextrose agar (PDA) ved 20°C. Hver søyle er snitt av 3 gjentak (tre skåler av hvert isolat innen gjentak). (Rød: "gammel" genotype, blå: "ny" genotype.)

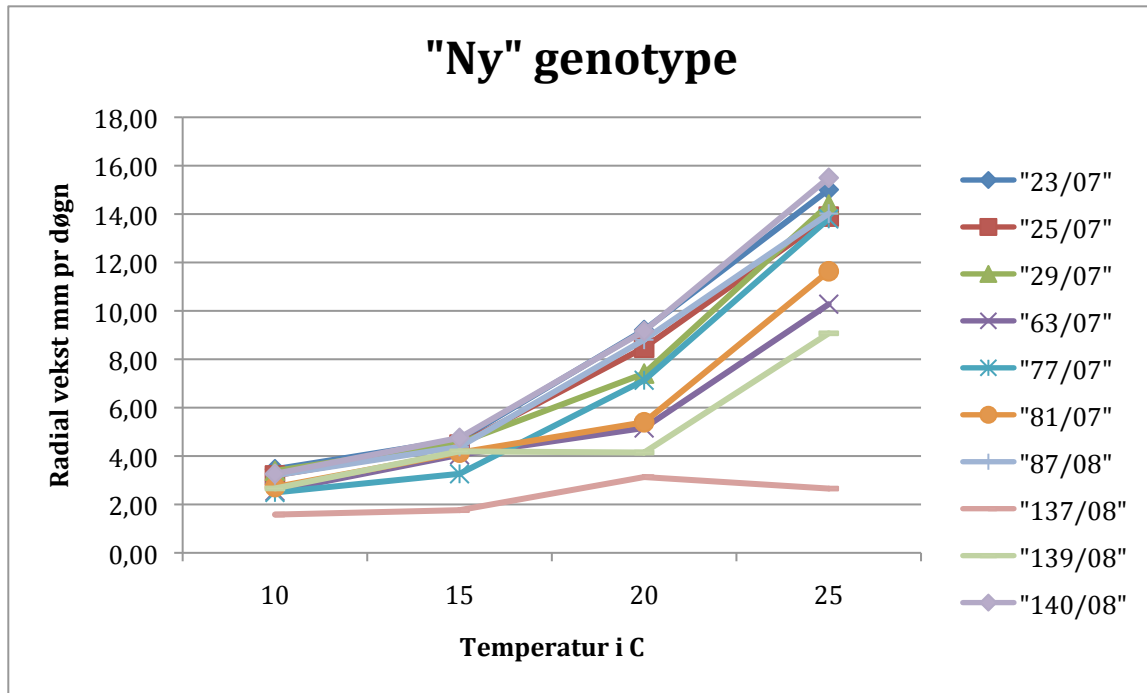


Figur 14: Vekstrate *in vitro* for 22 isolater *Fusarium graminearum* dyrket på potato dextrose agar (PDA) ved 25°C. Hver søyle er snitt av 3 gjentak (tre skåler av hvert isolat innen gjentak). (Rød: "gammel" genotype, blå: "ny" genotype.)

Figur 16 viser at isolat 137/08 skiller seg ut ved alle temperaturene som det mest saktevoksende og at vekstraten ikke ser ut til å påvirkes av temperaturen. Veksten til isolatet var kun som tynne tråder av mycel og var ganske atypisk i forhold til majoriteten av isolatene (Figur 10). Samme vekstmåte hadde også isolat 34/08 og 39/08, men disse var ikke like saktevoksende. Ut fra figur 15 kan vi se at særlig isolat 34/08 har en mye flatere vekstkurve enn de andre, men de responderte likevel på temperaturøkning med økt veksthastighet.

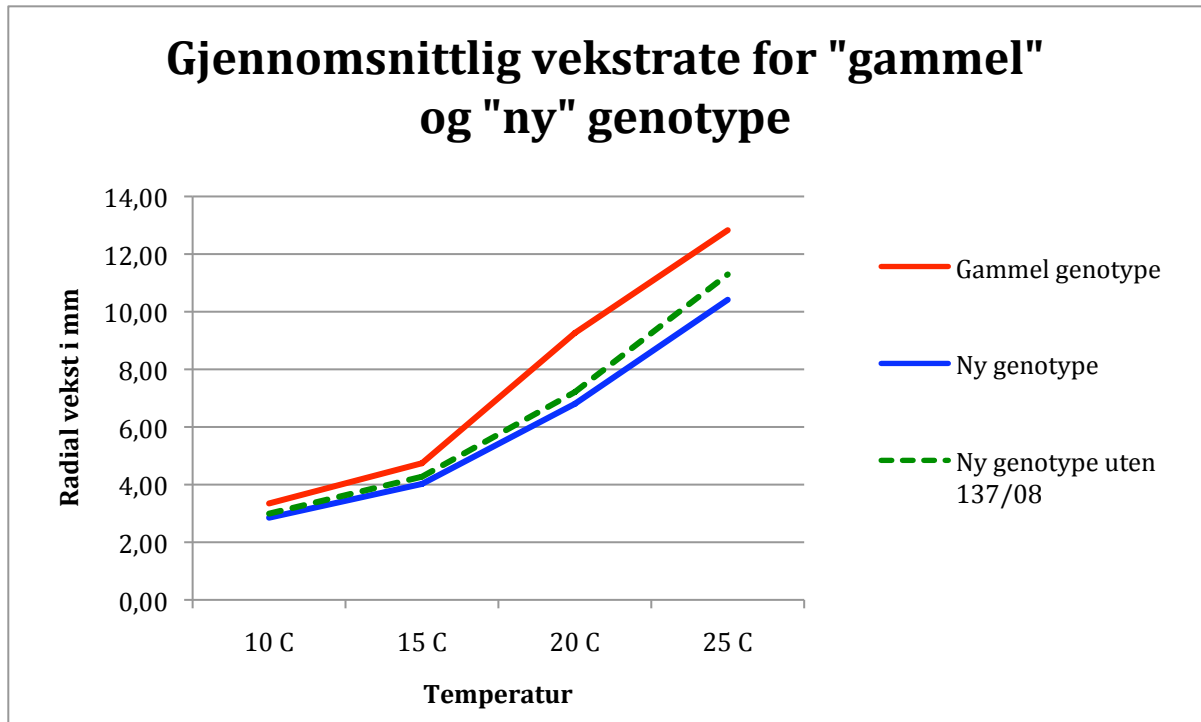


Figur 15: Vekstrate in vitro for isolater av *Fusarium graminearum* med "gammel" genotype dyrket på potato dextrose agar (PDA) ved temperaturene 10°C, 15°C, 20°C og 25°C. For hvert isolat er verdien snitt av 3 gjentak med hver tre skåler.



Figur 16: Vekstrate in vitro for isolater av *Fusarium graminearum* med "ny" genotype dyrket på potato dextrose agar (PDA) ved temperaturene 10°C, 15°C, 20°C og 25°C. For hvert isolat er verdien snitt av 3 gjentak med hver tre skåler.

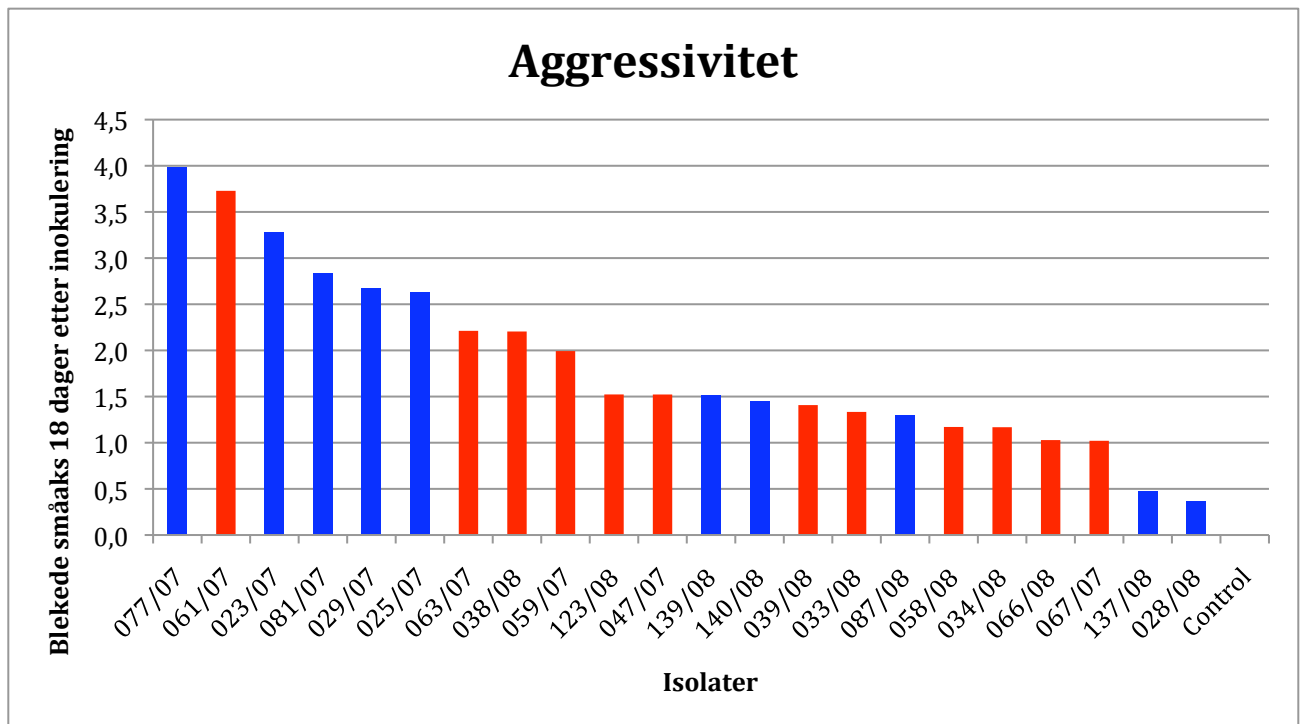
For å få et klart bilde av forskjellen mellom "gammel" og "ny" genotype ble gjennomsnittlig vekstrate for hver av de to gruppene beregnet. Figur 17 viser gjennomsnittlig veksthastighet ved de ulike temperaturene for isolater av henholdsvis "gammel" og "ny" genotype. Fordi isolat 137/08 har en helt annen vekstkurve enn de andre isolatene, ble denne tatt ut før det ble laget figurer som viste snittverdien for alle isolater av "gammel" og "ny" genotype. Det ble i stedet laget en stiplet linje der 137/08 er med. Forholdet mellom gjennomsnittlig veksthastighet for de to genotypene er ganske likt ved temperaturene 10°C og 15°C, men ved 20°C og 25°C ligger veksthastigheten hos isolater av "gammel" genotype betydelig høyere (Figur 17). Den prosentvise forskjellen er veldig lik ved temperaturene 10°C, 15°C og 25°C. For disse er forskjellen ca 10%, men for 20°C ligger den på over 20%. Disse tallene er uten isolat 137/08. Dersom denne tas med, er tallene noe høyere.



Figur 17: Gjennomsnittverdier av tre gjentak for vekstrate in vitro for isolater av *Fusarium graminearum* med "gammel", "ny" genotype og "ny" genotype uten isolat 137/08, dyrket på potato dextrose agar (PDA) ved temperaturene 10°C, 15°C, 20°C og 25°C

Aggressivitet

Figur 18 viser at aggressivitet hos isolatene varierer mellom 4,0 og 0,3 blekede småaks per aks. Flertallet av de nye isolatene hadde et gjennomsnitt på mellom 4,0-2,6 bleika småaks per aks, mens alle de gamle, unntatt ett (61/07) ligger mellom 2,3 og 0,4 bleika småaks per aks. Variansanalyse viste signifikant forskjell i aggressivitet mellom isolater av "gammel" og "ny" genotype, der "nye" var mer aggressive enn "gamle". Dette kan en også se ut fra figur 18. Tallene vist i figuren her er gjennomsnittet av blekede småaks i hver potte og for de fire blokkene. Figur 19 viser et aks fra forsøket angrepet av *F. graminearum*.



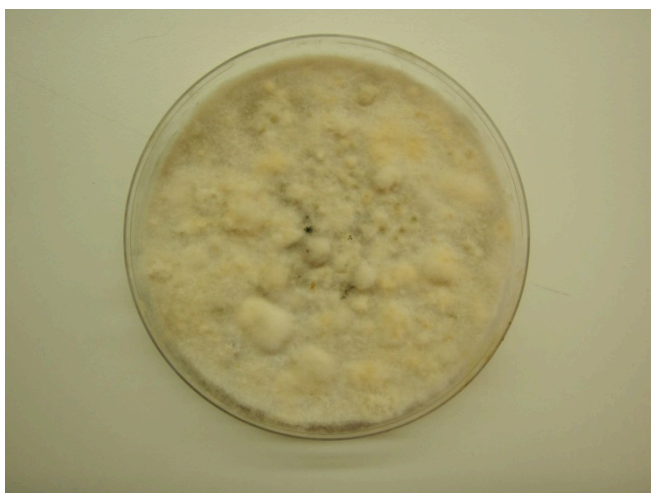
Figur 18: Variasjon i aggressivitet for 22 isolater av *Fusarium graminearum* fremstilt som gjennomsnittlig antall blekede småaks per inokulerte hveteaks 18 dager etter inokulering. (Blå: ny genotype, rød: gammel genotype.)



Figur 19: Hveteaks angrepet av *Fusarium graminearum*. (Foto: G. B. Larsen 2009)

Perithecieproduksjon

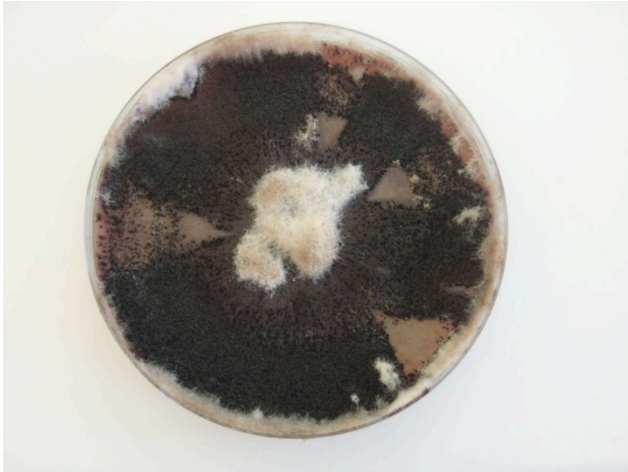
Figur 23 viser perithecieproduksjon for alle isolatene ved 15, 20 og 25°C, vurdert etter en klassifisering i 4 kategorier, 0=ingen funn av perithecier ved siste registrering, 1=enkelte perithecier, 2=middels antall perithecier, 3=mange perithecier. Kategoriene 1, 2 og 3 er vist på figurene 20, 21 og 22.



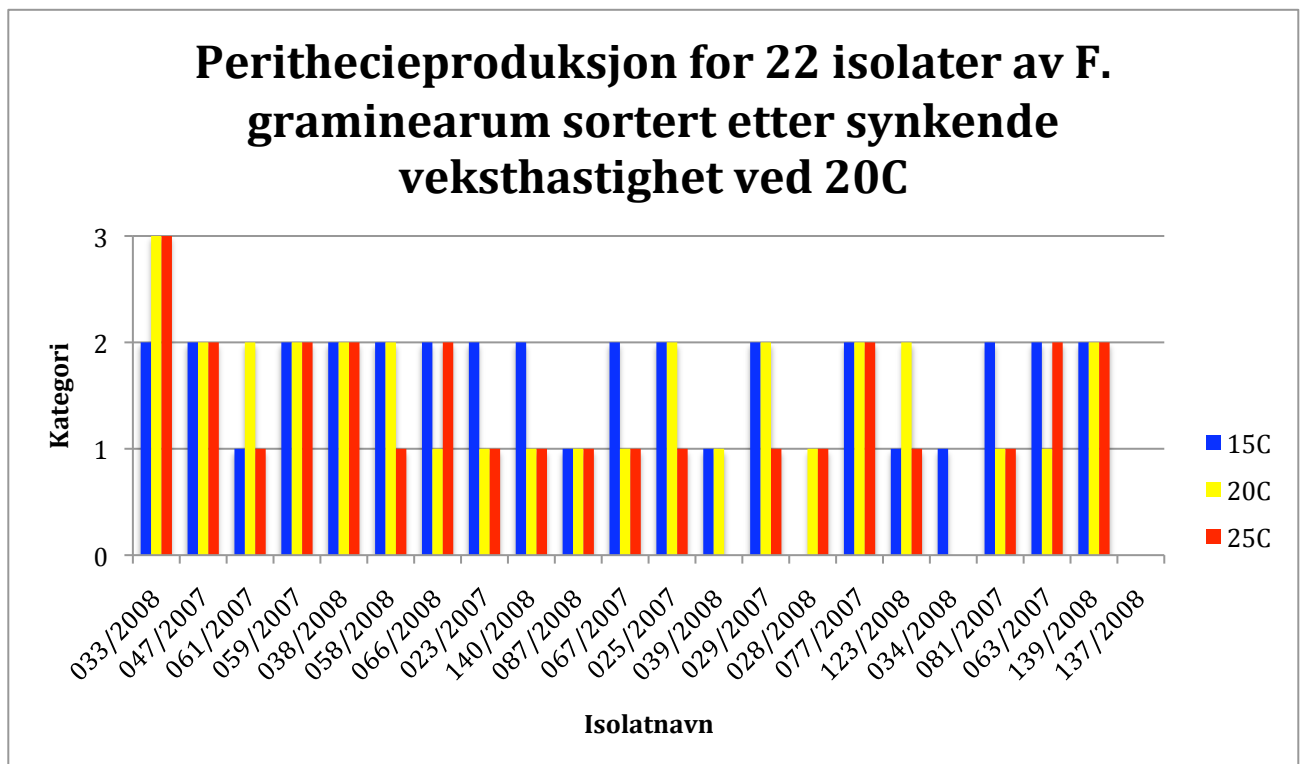
Figur 20: Perithecier av *Fusarium graminearum* på mung bean agar (MBA). Bildet viser Isolat 61/07 som ble vurdert til å ha en lav produksjon av perithecier (kategori 1). (Foto: G.B. Larsen 2010)



Figur 21: Perithecier av *Fusarium graminearum* på mung bean agar (MBA) kategori 2 (Isolat 59/07). Denne skåla har også en del perithecier under mycelet som ikke kan sees på bildet. (Foto: G.B. Larsen 2010)



Figur 22: Perithecier av *Fusarium graminearum* på mung bean agar (MBA) kategori 3 (Isolat 33/08). (Foto: G.B. Larsen 2019)



Figur 23: Produksjon av perithecier hos 22 isolater av *Fusarium graminearum* på gulrotagar ved temperaturene 15, 20 og 25°C. Kategorier: 0=ingen funn av perithecier ved siste registrering, 1=enkelte perithecier, 2=middels antall perithecier, 3=mange perithecier.

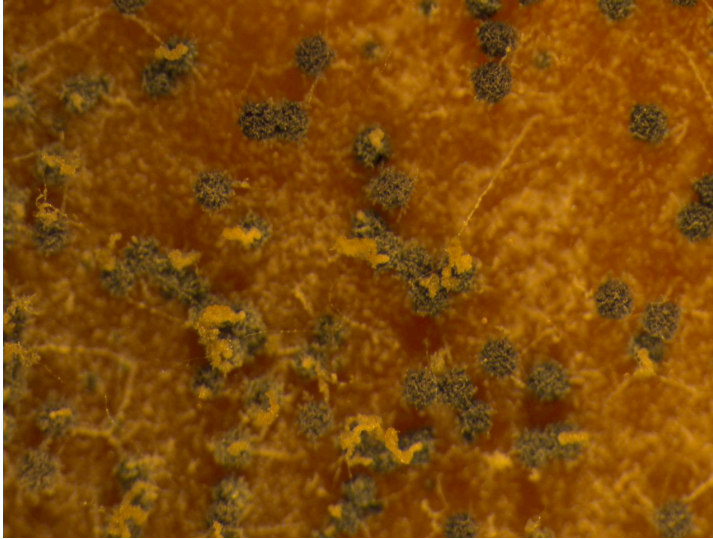
Temp	Gjennomsnittlig perithecieproduksjon (0-3)	
	Gamle	Nye
15°C	1,50	1,70
20°C	1,58	1,30
25°C	1,33	1,20

Tabell 3: Gjennomsnittlige verdier for produksjon av perithecier hos *Fusarium graminearum* for isolater av "gammel" og "ny" genotype ved temperaturene 15, 20 og 25°C.

Det ble utført en variansanalyse på tallene og denne viste at det ikke var signifikant forskjell evne til å produsere perithecier hos "ny" og "gammel" genotype (Vedlegg 4c). Man ser også i figur 23 at det ikke er noen tydelige forskjeller i evnen til å produsere perithecier mellom "gammel" og "ny" genotype.

For enkelte isolater var det relativt stor variasjon mellom produksjonen innen hver temperatur. Det er også et lite datagrunnlag for å trekke noen konklusjoner. Isolat 33/08 er helt klart det som produserer mest perithecier. Skålene ble omtrent dekket av disse. Isolatet hadde en dårlig evne til å produsere konidier. Ved produksjon av inokulum var det derimot vanskelig å finne nok konidier til å oppnå ønsket konsentrasjon med sporer.

Skålene ble stående i skapet etter siste registrering av perithecieproduksjon. Dette ble gjort for å kunne følge med på videre utvikling av perithecier og registrering av hvorvidt disse ble modne (dvs. produserer ascosporer). Det viste seg at alle isolater produserte perithecier ved alle temperaturer bare de fikk tid nok på seg. Det ble også undersøkt om peritheciene inneholdt ascosporer 8 uker etter poding. Det ble funnet ascosporer hos alle isolater, med unntak av isolat 87/08. Etter så lang tid vil det bli et problem at agaren tørker helt ut, og dette kan derfor bli en begrensende faktor for produksjonen av ascosporer hos de mest saktevoksende isolatene.

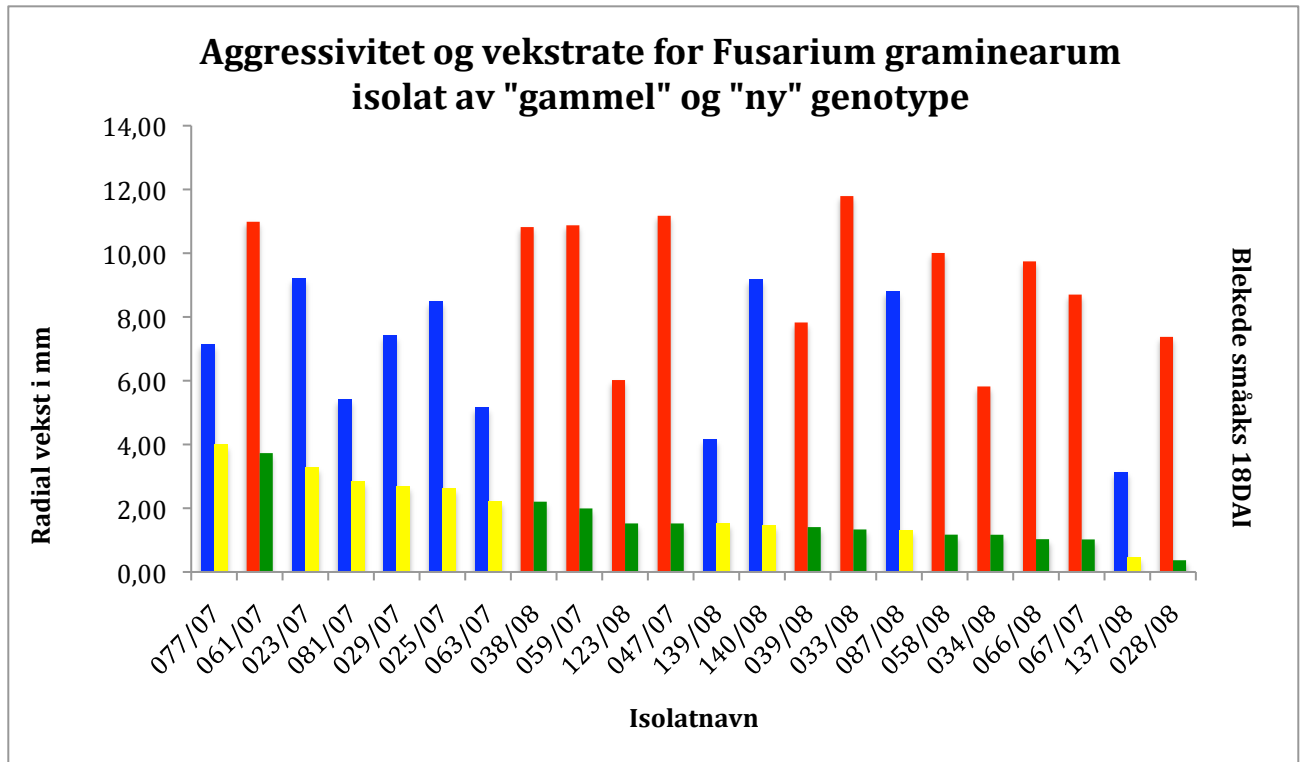


Figur 24: Modne perithecier med ascosporer av *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) etter vekst på gulrotagar. (Foto: G. B. Larsen 2010)

Sammenheng mellom de ulike egenskapene hos de 22 isolatene av *F. graminearum*

Tallene fra aggressivitet- og vekstrategiforsøkene ble sammenfattet i en sammenligning i MiniTAB, og resultatene fra begge forsøkene ble kombinert i en figur (figur 25). I denne figuren ble 20°C valgt ut som illustrasjon, fordi dette var dagtemperaturen som ble holdt under aggressivitetsforsøket i veksthuset. Tallene brukt i figuren er gjennomsnittstall innad for hvert isolat. Resultatene fra forsøket med perithecieproduksjon ble sammenlignet med tallene fra aggressivitet og vekstrategiforsøkene.

Sammenligninger i Minitab viste at det ikke var noen sammenheng mellom egenskapene aggressivitet og vekstrate (Vedlegg 4d). Dette kan en også enkelt se ut fra figur 25.



Figur 25: Aggressivitet og vekstrater hos 22 isolater av *Fusarium graminearum*, sortert etter fallende aggressivitet. (Gul: Aggressivitet "ny" genotype, Grønn: Aggressivitet "gammel" genotype, Blå: Vekstrate "ny" genotype, Rød: Vekstrate "gammel" genotype.)

Ved gjennomføringen av sammenligninger av gjennomsnittlig perithecieproduksjon opp mot aggressivitet og vekstrate, ble det besluttet å ta ut de avvikende isolatene 34/08 og 137/08 siden disse to påvirket resultatet mye. Sammenligningene viste at det ikke var noen sammenheng mellom gjennomsnittlig perithecieproduksjon og vekstrate ved 10°C, 15°C, 20°C og 25°C (Vedlegg 4f). Det samme gjelder perithecieproduksjon ved de ulike temperaturene opp mot tilsvarende temperaturer fra vekstrateforsøket (uten isolat 137/08) (Vedlegg 4e).

Kapittel 4 - Diskusjon

Det ble registrert en signifikant forskjell i *in vitro* vekstrate mellom de 22 ulike isolatene av *F. graminearum* som ble undersøkt. Tilsvarende studier viser også at det er variasjon i vekstrate mellom ulike isolater av *F. graminearum*. I forsøk gjort av Brennan et al. ble det funnet forskjeller mellom isolater fra forskjellige europeiske land. Tallene i våre forsøk ligger en del over gjennomsnittlig vekst funnet av Brennan et al., særlig ved 25°C (Brennan, Fagan et al. 2003). Det samme gjelder forsøk utført av Walker et al. ved 25°C (Walker, Leath et al. 2001). En av årsakene til dette kan være at i motsetning til de andre, ble våre forsøk gjennomført i mørke. Snyder fant i en studie av forskjellige *Fusarium*-arter at disse produserte konsekvent mer mycel i mørke enn i lys (Snyder 1941). Vi kan heller ikke utelukke feilkilder av teknisk karakter omkring temperaturen i skapene som ble brukt. Ved 25°C der forskjellen var størst, var det også nødvendig å bytte ut temperaturføleren i skapet etter tredje gjentak.

Flesteparten av isolatene fra våre studier ser ut til å ha en optimumvekstrate som ligger på 25°C eller høyere. Kurvene viser ingen tegn til å flate ut. Dette stemmer også overens med andre undersøkelser som viser at optimumstemperaturen for *F. graminearum* ligger omkring 25°C (Campbell and Lipps 1998; Brennan, Fagan et al. 2003). En økning i vekstrate med økende temperatur gjaldt for alle isolatene, med unntak av isolat 137/08 som hadde en noe atypisk vekst og en meget lav produksjon av mycel i forhold til de andre isolatene. Dette isolatet er av "ny" genotype.

I forsøket er temperaturene 10°C, 15°C, 20°C og 25°C benyttet. Sett ut fra et praktisk synspunkt vil temperaturen i vekstsesongen i snitt aldri komme opp i de høyeste temperaturene her på våre breddegrader. Men selv om 25°C ikke forekommer så mye av tiden, vil det likevel være interessant å se på dette da en på den måten kan trekke ut kunnskap om hvordan et varmere klima vil påvirke veksten av soppen. Ut fra forsøkene her ser det ut til at *F. graminearum* trives godt under høye temperaturer. Dette stemmer godt overens med hva Xu et al. skriver om at *F. graminearum* forekommer mest under varme forhold (Xu, Nicholson et al. 2008)

Ut fra variansanalysen som ble gjennomført, ble det funnet at isolater som her betegnes som "nye" genotyper var signifikant mer saktevoksende enn de isolatene som tilhørte gruppen med betegnelsen "gammel" genotype. Dette gjaldt ved alle temperaturer. En kan spørre seg om hvilke andre egenskaper som vil være annerledes for de mer saktevoksende isolatene. Den lavere veksten kan kanskje skyldes øket produksjon av mykotoksiner. Brennans studie av *F. graminearum* fra Italia, Ungarn og Irland viser at italienske isolat var mer patogene enn fra de to andre landene ved alle temperaturene som ble studert (10, 15, 20, 25 og 30°C). Ved 10 og 15°C var italienske isolat mer saktevoksende, men var likevel mye mer patogent enn isolat fra de to andre landene. Ved 20 og 25°C har italienske isolat en mye høyere veksthastighet, men her er det nesten ingen forskjell i patogenitet (Brennan, Fagan et al. 2003). Xu et al. fant positiv korrelasjon mellom grad av angrep og mykotoksiner (Xu, Monger et al. 2007).

I forsøkene som er beskrevet i denne oppgaven var det en signifikant forskjell i aggressivitet mellom de forskjellige *F. graminearum* isolatene. Dette er også funnet i andre undersøkelser (Cumagun, Rabenstein et al. 2004). Isolater med betegnelsen "ny" genotype hadde en signifikant høyere aggressivitet enn de av "gammel" genotype. I hvete er det funnet sammenheng mellom *F. graminearum* isolaters produksjon av DON og deres aggressivitet (Bai, Desjardins et al. 2002; Wanyoike, Walker et al. 2002; Jansen, von Wettstein et al. 2005). Vi kan derfor spekulere i om de mest aggressive isolatene har en høyere produksjon av DON og videre om isolatene med "ny" genotype har en høyere produksjon av DON og om dette er en av faktorene som gjør de signifikant mer aggressive enn isolater av "gammel" genotype. Derimot har vi ikke målt mykotoksinproduksjonen for isolatene som er brukt her i dette forsøket.

Mer aggressive isolater vil raskere kunne etablere seg og derfor gjøre en større skade, og da særlig når det kommer til produksjonen av mykotoksiner. I en kombinasjon med mange andre faktorer kan en generell økt aggressivitet i populasjoner av *F. graminearum* være en av grunnene til den observerte økningen i utbredelse av *F. graminearum* i Norge de senere år. *Fusarium graminearum* har dessuten vist seg å være mer aggressiv ved inokulering i hvete enn artene *F. avenaceum*, *F. culmorum* og *F. poae*

(Xu, Monger et al. 2007), arter som tidligere har vært av de vanligst forekommende her i landet (Kosiak, Torp et al. 2003).

Vi har kun benyttet enkeltsporeisolater i våre forsøk. Xu et al. fant i forsøk med kontrollert inokulering med fire *Fusarium*arter i hvete, at bruk av blanding med flere *Fusarium*-arter ga mindre soppbiomasse og en dramatisk økning av produksjonen av mykotoksiner (Xu, Monger et al. 2007). Ute i felt vil det alltid være et mangfold av sopper som angriper kornet. Bruk av enkeltsporeisolater vil derfor bare gi et bilde av hvordan isolatene virker hver for seg, men ikke hvordan samspill mellom disse vil påvirke aggressivitet og produksjon av mykotoksiner.

Det ble registrert mjøldoggangrep på plantene som ble brukt i aggressivetsforsøket. I området omkring Åsbakken ligger det flere forskjellige veksthus. I tillegg til fare for inokulum utenfra vil det stadig være fare for å få inn sykdommer som mjøldogg i vekststrømmet. Det kan spres enten med vind eller med personer som går ut og inn av vekststrømmene. Vi fikk dessverre ikke vite om muligheten til å sette inn svoveldamping før det allerede var registrert angrep av mjøldogg. Ideelt sett burde denne vært satt inn fra planting og heller vært tatt ut ved inokulering. I dette tilfellet ble det dessverre nødvendig å sprøyte slik at mjøldoggen ikke ødela forsøket. Selv om ikke Forbel 750 har noen kjent effekt mot *Fusarium*, kan man ikke garantere at dette gir noen innvirkning på forsøket. Et angrep av mjøldogg vil også kunne initiere forsvarsresponsen i plantene, og dette kan ha påvirket resultatet.

I forsøket ble det funnet variasjon mellom de ulike isolatenes evne til å produsere perithecier. Det lyktes derimot å dyrke frem perithecier for alle isolater ved alle temperaturer, bare de fikk nok tid på seg. Dette stemmer godt overens med beskrivelsen om at *F. graminearum* er homotallisk og kan produsere perithecier uten å måtte krysses med andre isolater (Leslie and Summerell 2006). Den største variasjonen lå i hvor lang tid isolatene brukte på å danne perithecier og ved mengde perithecier som ble produsert.

Det ble ikke funnet noen signifikant forskjell i isolatenes evne til å produsere perithecier ved de forskjellige temperaturene. Dufault et al. rapporterer om at perithecier dannes og

modnes i temperaturområdet fra 12 og 28°C (Dufault, De Wolf et al. 2006), og det passer godt med funnet av perithecier ved de forskjellige temperaturene i våre forsøk. Det kunne vært interessant og sett på norske isolaters nedre temperaturgrense for dannelse av perithecier. Dette ble i vårt tilfelle begrenset av tekniske årsaker.

Det ble ikke funnet noe forskjell mellom isolater kategorisert som "gammel" eller "ny" genotype i evne til å produsere perithecier. Det er derfor grunn til å anta at en økning i evne til å produsere perithecier ikke er av en av grunnene til økt forekomst av *F. graminearum*. Derimot kan den økte vekstsesongen vi har, ført til at forholdene har blitt lagt mer til rette for produksjonen og modningen av perithecier. En lenger vekstsesong som Rafoss beskriver (Rafoss 2009), kan være nettopp det som skal til for modningen av perithecier. Det ville vært interessant i våre forsøk og også hatt med isolater med genotyper som ikke er funnet igjen på 2000-tallet. Evne til å produsere perithecier kan nettopp være en av årsakene til at enkelte genotyper som ble isolert i felt på 1990 tallet (også) ble funnet igjen på 2000-tallet. Det ville likedan vært interessant å gjøre undersøkelser som sammenlignet hvor lang tid de forskjellige isolatene trenger for å danne ascosporer.

Selv om registreringsmetoden i forsøket med perithecieproduksjon bare er en skjønnsmessig vurdering, vil det likevel gi et lite innblikk i isolatenes evne til å produsere perithecier. Av praktiske årsaker ble skålene innen hver temperatur skrapet på samme tidspunkt. Grunnet forskjeller i vekstrate vil noen skåler ha vokst ut til kanten av skåla med god margin, mens andre ikke er fullt utvokst. Dette vil trolig kunne påvirke dannelsen av perithecier.

Posene som ble benyttet på skålene i begynnelsen var ingen stor suksess. Særlig ved 25°C ble det mye kondens og mer mycelvekst enn det som ble observert i for-forsøket. Dette kan ha en sammenheng med liten lufttilgang i de nesten tette posene og kanskje dårligere mulighet for NUV-lyset til å trenge igjennom. Klimaet som blir inne i skålene, vil være av avgjørende betydning for hvordan produksjonen av perithecier vil arte seg. Kondensen i skålene kan ha påvirket utfallet av forsøkene.

Mellom egenskapene vekstrate og aggressivitet ble det ikke funnet noen korrelasjon. Men det er store variasjoner innad i isolatene for de forskjellige egenskapene. Noen eksempler er: Isolat 77/08 som er det mest aggressive isolatet fra veksthusforsøket, ligger blant den laveste tredjedelen når det gjelder vekstrate. For isolat 61/07 som var det nest mest aggressive er bildet motsatt, og dette isolatet er blant de mest rasktvoksende *in vitro*. Isolat 28/08 ligger lavest på aggressivitet, men har høy vekstrate ved 25°C.

Hos egenskapen perithecieproduksjon ble det heller ikke funnet noen korrelasjon mot aggressivitet og vekstrate.

En ville kanskje forvente at høy vekstrate har positiv sammenheng med aggressivitet. I likhet med forsøk gjort av Brennan et al. ble det ikke funnet sammenheng her (Brennan, Fagan et al. 2003). Det tyder derfor på at det er andre mekanismer som påvirker forskjellen i aggressivitet. En av disse kan tenkes å være produksjon av mykotoksiner (Bai, Desjardins et al. 2002; Jansen, von Wettstein et al. 2005).

Sammenfattende diskusjon

Ut fra forsøkene viser det seg at isolater av "ny" genotype er signifikant mer aggressive og signifikant mer saktevoksende enn isolater med "gammel" genotype. Når det gjelder perithecieproduksjon, ble det ikke funnet noen forskjeller mellom "gammel" og "ny" genotype. En ville kanskje forvente at høy vekstrate har positivt sammenheng med aggressivitet. Dette ble ikke funnet her, og det tyder derfor på at det er andre mekanismer som påvirker forskjellen i aggressivitet. En av disse kan tenkes å være produksjon av mykotoksiner (Bai, Desjardins et al. 2002; Jansen, von Wettstein et al. 2005).

Isolatene ble valgt ut fra AFLP dendogrammet for å få med isolater som er så ulike hverandre som mulig. Hvor utbredt forekomsten av de forskjellige isolatene er ute i naturen er dessverre ikke kjent, ei heller produksjonen av mykotoksiner. Hadde en kjent til dette, kunne en trukket sikrere konklusjoner om hvilke egenskaper som er suksesskriterium for soppen ute i naturen. Det er heller ikke kartlagt om den økte forekomsten av DON (Aamodt 2008) skyldes større forekomst av sopp eller om soppen produserer mer av mykotoksinet. Enkelte år finnes det korrelasjon mellom innhold av sopp DNA og DON for *F. graminearum* og *F. culmorum*, men dette ser ut til å variere en god del (Hofgaard pers med).

Det er ingen garanti for at isolatene innen kategorien "ny" genotype ikke var tilstede på et tidligere tidspunkt. Ideelt sett burde kanskje noen gamle isolater som ikke er funnet senere, vært med for å kartlegge hva som kjennetegner disse. Dette ville vært interessant for å kunne skaffe seg et bilde over hva som skiller disse fra nyere isolater og på den måten kunne se hvorfor disse ikke lenger er forekommende. Av praktiske årsaker var det nødvendig å begrense utvalget isolater i forsøket. De 22 isolatene som er valgt ut er allerede mange nok når det gjelder tilgang på plass i veksthus og hyller og tiden arbeidet med de forskjellige arbeidsoperasjonene tar.

Det er funnet at mange av isolatene isolert på 2000-tallet er nært beslektet med isolater som finnes i utlandet (Aamodt pers. med.). Isolater med antatt kjemotype 15ADON var ikke å finne blant de gamle isolatene, men finnes blant de nye. I andre land (som bla USA

og Tyskland) har derimot 15ADON vært den vanlige (Tamburic-Ilincic, Gaba et al. 2008). Det er derfor sannsynlig at enkelte av de isolatene vi har isolert fra norskdyrket korn i de senere åra, har blitt innført fra andre land. Hvordan disse har funnet veien til Norge er ikke lett å si, men mulighetene er mange. En kan derfor anta at populasjonen av *F. graminearum* i Norge har endret seg de senere år, trolig som følge av innføring av nye isolater og ved mutasjoner. En generell trend i nordvest Europa er også økt forekomst av *F. graminearum* på bekostning av den nært beslektede *F. culmorum* (Kosiak, Torp et al. 2003).

Ma et al. fant at *Fusarium* har stor evne til å utveksle store deler av genomet mellom isolater, og det kan derfor hurtig oppstå nye isolater (Ma, van der Does et al. 2010). Denne egenskapen kan også være avgjørende når det gjelder muligheten for å kunne ha et bredt spekter av vertsplanter. Studiene som er gjort på potet i USA (Delgado, Schwarz et al. 2010) viser at *Fusarium graminearum* har et stort spekter med vertsplanter. Hvis dette skyldes soppens evne til å tilpasse seg nye verter, vil det kunne skape problemer for valg av vekster for å redusere smittepress av *Fusarium* i et vekstskifte, og særlig i et system med redusert jordarbeiding. I Norge og hele den vestlige verden er det en stadig økning av bruk av redusert jordarbeiding i landbruket både av forskjellige økonomiske grunner og av miljøhensyn. Dette skaper mange konflikter hvor en må veie fordeler og ulemper opp mot hverandre.

Konklusjon

Resultatene i denne oppgaven tyder på at det i norske populasjoner av *Fusarium graminearum* kan ha skjedd en endring av enkelte egenskaper. Dette kan være en av årsakene til den økte forekomsten av *F. graminearum* som er registrert i norsk kornproduksjon.

Det ble vist at isolater med "ny" genotype, som hadde en genotype som var ulik genotyper som tidligere har vært isolert i Norge, var signifikant mer aggressive i hvete enn isolater av "gammel" genotype. Mer aggressive isolater vil ha større evne til å angripe og å spre seg i kornplantene. Dette kan føre til økte problemer med sykdommen og kan derfor være en årsak til økt forekomst av *F. graminearum*.

Isolatene av "ny" genotype vokste derimot signifikant saktere *in vitro* på PDA enn isolatene av "gammel" genotype. Dette tyder på at en høy veksthastighet *in vitro* ikke nødvendigvis er noen fordel, men innen dette ser vi variasjoner.

Når det gjelder evnen til å danne perithecier, ble det ikke funnet noen signifikante forskjeller mellom de to gruppene, og det er trolig ikke noen endring i denne egenskapen. Hastigheten for dannelse og modning av disse ble ikke undersøkt, men disse egenskapene kan være en medvirkende årsak til økt forekomst av soppen hvis disse egenskapene har endret seg.

Det ble heller ikke funnet noen signifikante sammenhenger mellom de forskjellige egenskapene som ble undersøkt. Dette tyder på at det er andre egenskaper som påvirker variasjonen i aggressivitet, vekstrate og produksjon av perithecier.

Det er også andre årsaker en kan trekke fram for å forklare den økte forekomsten av DON og *F. graminearum*. Det er en klar sammenheng mellom jordbearbeidingsmetode og forekomst av *Fusarium*, og den økte bruken av redusert jordarbeiding har trolig mye av skylden for dette. Klima spiller også en viktig rolle for både spredning, produksjon av

inokulum og inokulering av planter. En lenger vekstsesong kan være med på å gi soppen ytterligere bedre forhold fremfor kulturplantene, både når det gjelder produksjon av konidier og ascosporer. Også fordelingen av vær i løpet av vekstsesongen er viktig. Særlig perioden omkring blomstring hos kornet er kritisk. Varme og fuktige forhold i denne perioden øker faren for angrep av *F. graminearum*. Endringer av soppens egenskaper både gjennom naturlige mutasjoner og gjennom mulig spredning fra andre steder kan også være en av årsakene. En eventuell øket produksjon av DON hos nyere isolater er en egenskap som bør studeres.

Fusarium culmorum var tidligere den dominerende produsenten av DON i Norge, men denne rollen er nå blitt tatt over av *F. graminearum*. Dette gjelder også ellers i nord Europa. Det er ikke registrert produksjon av perithecier hos *F. culmorum* og en kan anta at *F. graminearum* har et fortrinn når det gjelder spredning over lengre avstander med sin produksjon av ascosporer.

Andre faktorer som kan være årsak til økt forekomst av *F. graminearum* er ensidig vekstskifte og bruk av lite resistente sorter. Sprøyting mot andre soppsykdommer kan også gi *F. graminearum* en fordel i form av mindre konkurranse.

Vedlegg

Vedlegg 1: Oppskrifter

SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar)

Ingredienser:

- 1l destillert vann
- 1.0g KH_2PO_4
- 1.0g KNO_3
- 0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0.5g KCl
- 0.2g Glukose
- 0.2g Sukrose
- 20g Agar

Fremgangsmåte:

Bland stoffene med destillert vann og autoklaver.

Vannagar

Ingredienser:

- 1l destillert vann
- 20g agar

Fremgangsmåte:

Bland vann og agar. Autoklaver i 20 min.

PDA (Potato Dextrose Agar)

Ingredienser:

- 250g poteter (vasket og skjært i terninger)

- 500 ml destillert vann
- 20g dextrose
- 15g agar

Fremgangsmåte:

Kok potetene til de er myke. Fyll dextrose og vann i en flaske og rist dette. Bland deretter inn potetene og fyll på agar og vann til volumet blir 1l. Autoklaver i 20min.

Gulrotagar/Carrot Agar (CA)

Ingredienser:

- 400 g gulrøtter (vasket og skåret terninger)
- 1 liter destillert vann
- 20 g agar

Fremgangsmåte:

Autoklaver gulrøttene med 400 ml destillert vann i 25 minutter. Gulrøtter og væske lages så til en puré og tilsettes vann til et totalt volum på 1 l. 20g agar røres så inn og det hele autoklaveres.

Mung Bean Agar (MBA)

Ingredienser:

- 40g Mungbønner (*Vigna radiata*)
- 1 liter destillert vann
- 15g Difco agar

Fremgangsmåte:

MBA lages av Mungbønner. Vann kokes opp og 40g bønner legges i. Plata skrues så ned så det så vidt bobler. Bønnene kokes så under lokk i ca 18 minutter. Bønnene må taes av plata før de sprekker. Dette filtreres gjennom fire lag osteklede, og det tilsettes vann til totalt volum er 1 liter. Deretter tilsettes 15 g agar, og hele blandingen autoklaveres.

Vedlegg 3: Etikett Forbel 750



Sprøytemiddel mot soppsykdommer i korn

Sammensetning:
Fenpropimorf 750 g/l
Klebe-, sprede- og oppløsningsmidler 210 g/l

Irriter øynene, luftveiene og huden.
Mulig fare for fosterskade.
Meget giftig for vannlevende organismer; kan forårsake uønskede langtidsvirkninger i vannmiljøet.
Unngå innånding av sprøytetåke.
Unngå kontakt med huden og øynene.
Oppbevares innelåst og utilgjengelig for barn.
Bruk egnet verneutstyr (se forsiktighetsregler)
Uskadeliggjør tomemballasjen (se avfallshåndtering)

HELSEKADELIG MILJØKADELIG

BEHANDLINGSFRIST: Korn: 4 uker

Avgiftsklasse 3

Tilvirker:
BASF SE
67056 Ludwigshafen
Tyskland

Importør:
BASF AS
Leangbukta 40
Postboks 233
NO-1372 Askar
Tel: 66 79 21 00

Opplysninger i nødtilfelle:
Giftnormasjonen
Tlf 22 59 13 00 eller Basf vakt
Telefon: 0049 180 2273 112

REG. NR. 2002.37.05

Nettoinnhold: **1 Liter e**

Produksjons nr og dato:
Se emballasjen

Bruksrettleiingen må følges, slik at man unngår risiko for mennesker og miljø.
Det er forbudt å bruke Forbel 750 i strid med godkjent bruksområde, behandlingsfrist og å overskride den maksimale tillatte dosering.

BRUKSOMRÅDE

Forbel 750 er tillatt brukt mot soppsykdommer i korn.

BEHANDLINGSFRIST

Korn må ikke behandles senere enn 4 uker før høsting.

VIRKING

Forbel 750 er et systemisk middel som tar raske opp og transporteres oppover i plantens. Ny tilvoks etter sprøyting beskyttes derfor i en viss grad. Forbel 750 stopper utvikling av soppen raske og hindrer videre spredning. Raske oppvekst og god vekring oppnås også ved lave temperaturer. Virkningen påvirkes lite av regn kort tid etter sprøyting. Langtidsvirkningen ved bruk av normaldose er 3-4 uker avhengig av tilveksthastighet og srotspres. For å forbygge utvikling av resistens hos soppsoppstammer bør Forbel 750 brukes i veksting med andre oppmidler. Forbel 750 har god virkning mot mjøldugg og ulike rustsopper i alle kornslag. Preparatet har en viss virkning mot grå øyeflekk i bygg.

BRUKSRETTELEINING

Korn

Sprøyte tid: Sprøyting forebyggende eller ved begynnelsen angrep gir generelt best virkning, men god og hurtig kurativ virkning gjør at Forbel 750 også vil kombinere allerede utbrutte soppsopp.

Utregn å spesielt i tid når det samtidig er høglufttemperatur.

Dosering: Normaldose ved bruk av Forbel 750 alene er 100 ml/da. Mot mjøldugg kan dosen senkes til 50 ml/da ved forebyggende behandling. Virkningsvidden er da kortere og gjentatt behandling kan bli nødvendig hvis det er vedvarende smitte.

Mot gulrust, brunrust og grå øyeflekk brukes full dose når Forbel 750 brukes alene eller i blanding med Sportak 45. I blanding med Tif kan Forbel 750-dosen reduseres til 50 ml/da. Bruk 20-40 l vann pr. da.

Tillegging av sprøytevekst:

Forbel 750 kan blandes med aktuelle ugare, sopp-, insekt- og støtorkningsmidler. Fyll først halvparten av vannet, deretter tilsettes Forbel 750 og til slutt eventuelt andre preparater. Bruk av endstøper forrådes.

LAGRING

Forbel 750 må lagres frostfritt i uåpnet originalemballasje er preparatet holdbart i minst 2 år.

FORSIKTIGHETSREGLER

Bruk vernemasker av (f.eks. av nitrilgumm), øyevær, støvler og overnekkedress ved håndtering og bruk av preparatet. Ved langvarig sprøyting og når det er fare for ånding av sprøytetåke, skal halvmaske med kombinasjonsfilter A1P2 og L eller A1P3 brukes. Før man støtter i øynene, skylt straks grundig med store mengder vann og kontakt lege eller Giftinformasjonssentralen tel. 22 59 13 00. Vask hender og ansikt ved avbrudd i arbeidet. Klær ferdig med preparatet må fjernes straks.

Vask hender og ansikt når arbeidet er ferdig eller avbrutt. Ved uhell eller mistenke om langvarig kontakt legge eller Giftinformasjonssentralen. Arbeidst verneutstyr må nyttes dersom en går inn i behandlet område, eller hender behandlede plantedeler i en periode på 24 timer etter sprøyting.

RENGJØRING

Tomemballasjen skylles minst tre ganger med vann og innholdet tømmes i sprøytekanen. Resler i sprøytekanen fortynnes om lag 5 ganger med vann og spyttes ut til bruketledningen. Skylt sprøyteutrust med vann eller bruk på et sted som ikke gir fare for forurensning av vannforsyninger. Ved skifte av preparat for sprøyting i områder kulturer må sprøyteutrust rengjøres med soda, sårtakk eller annet anbefalt vaskemiddel.

AVFALLSHÅNDTERING

Grundig rengjort tomemballasje leveres med husholdningsavfall eller deponeres på offentlig fyllplass. Konsentrerte plantevernmiddelemner og ikke rengjort tomemballasje må innleveres til mottak for langt avfall. Ved skifte av preparat for sprøyting i jordfriske kulturer må sprøyteutrust rengjøres med soda, sårtakk eller annet anbefalt vaskemiddel.

Resistens

For mange oppmidler er det alvorlig risiko for forekomst av soppsyter, som er motstandsdyktige (resistente) overfor det aktive stoffet. Under spesielt dårlige betingelser kan en endring i middlets virkning derfor ikke utelukkes. Da det generelt ikke er mulig å forutse den konkrete risiko for resistensdannelse på grunn av de mange kultur- og arendelsesbetingelser og påvirkningsfaktorer, foreskrives vi oss ansvaret for eventuelle skader som følge av resistensdannelse. Den anbefalte doseringen fra BASF skal ubetinget overholdes for å unngå virkningsløp.

Mer

Det er mange faktorer som kan ha innflytelse på produktets virkning, spesielt sløtt- eller regionsspesifikke forhold. Herunder finner for eksempel vær- og jordforhold, kulturplanter, vaksidbruk, behandlingsgrader, anvendt mengde, blanding med andre produkter, forekomst av resisterende organismer, sprøyte teknik og så videre. Ved spesielt ugunstige forhold kan man ikke utelukke at det kan skje forandringer i produktets virkning eller at det kan oppstå skader på kulturplanter. For slike forhold har ikke produsent eller forhandler noe ansvar.



81032281 NO 0028-Norway

Vedlegg 4a: Statistikk Aggressivitet fra MiniTAB:

General Linear Model: R2blsm versus Genotype; Blokk

Factor	Type	Levels	Values
Genotype	fixed	2	G; N
Blokk	random	4	A; B; C; D

Analysis of Variance for R2blsm, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Genotype	1	10,551	10,551	10,551	9,42	0,003
Blokk	3	1,702	1,702	0,567	0,51	0,679
Error	83	92,924	92,924	1,120		
Total	87	105,177				

S = 1,05809 R-Sq = 11,65% R-Sq(adj) = 7,39%

Unusual Observations for R2blsm

Obs	R2blsm	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
47	5,00000	1,58390	0,24797	3,41610	3,32 R
48	5,00000	1,74299	0,24797	3,25701	3,17 R
61	4,80000	2,15205	0,25721	2,64795	2,58 R

Genotype	1	110,31	110,31	110,31	21,83	0,000
Gjentak*Temp	2	119,33	119,33	59,67	11,81	0,000
Error	235	1187,24	1187,24	5,05		
Total	241	4405,36				

S = 2,24769 R-Sq = 73,05% R-Sq(adj) = 72,36%

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-3,5374	0,5112	-6,92	0,000
Temp	0,58993	0,03031	19,46	0,000
Temp*Gjentak				
1	0,18759	0,03913	4,79	0,000
2	-0,00698	0,03913	-0,18	0,859

Unusual Observations for Snitt radial vekst pr døgn i m

Obs	Snitt radial vekst pr døgn i m	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
10	17,8800	12,8510	0,4310	5,0290	2,28 R
68	2,7100	8,9794	0,2938	-6,2694	-2,81 R
71	3,4600	11,8941	0,4221	-8,4341	-3,82 R
235	4,2100	8,9634	0,3065	-4,7534	-2,13 R
236	2,3300	7,6235	0,3065	-5,2935	-2,38 R
238	3,6000	12,8510	0,4310	-9,2510	-4,19 R
239	1,7100	10,5382	0,4310	-8,8282	-4,00 R
262	17,5200	12,8510	0,4310	4,6690	2,12 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

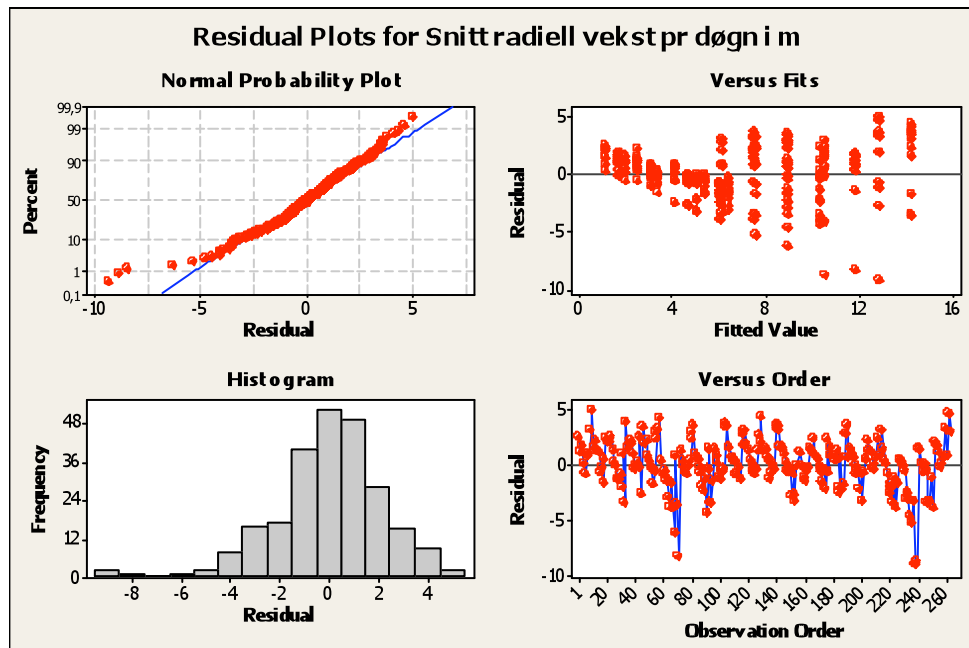
Dunnett 95,0% Simultaneous Confidence Intervals
Response Variable Snitt radial vekst pr døgn i m
Comparisons with Control Level
Genotype = G subtracted from:

Genotype	Lower	Center	Upper	
N	-1,928	-1,356	-0,7842	(-----*-----)
				-----+-----+-----+-----
				-1,80 -1,20 -0,60 0,00

Dunnett Simultaneous Tests
Response Variable Snitt radial vekst pr døgn i m
Comparisons with Control Level
Genotype = G subtracted from:

Genotype	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
N	-1,356	0,2902	-4,673	0,0000

Residual Plots for Snitt radial vekst pr døgn i m



Vedlegg 4c: Statistikk Perithecieproduksjon fra MiniTAB:

General Linear Model: Score versus Genotype

Factor Type Levels Values
 Genotype fixed 2 G; N

Analysis of Variance for Score, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Temperatur	1	1,1136	1,1136	1,1136	2,12	0,150
Genotype	1	0,0854	0,0854	0,0854	0,16	0,688
Error	63	33,0586	33,0586	0,5247		
Total	65	34,2576				

S = 0,724389 R-Sq = 3,50% R-Sq(adj) = 0,44%

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	2,0725	0,4459	4,65	0,000
Temperatur	-0,03182	0,02184	-1,46	0,150

Unusual Observations for Score

Obs	Score	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
1	0,00000	1,63131	0,16279	-1,63131	-2,31 R
5	3,00000	1,47222	0,12073	1,52778	2,14 R
6	3,00000	1,31313	0,16279	1,68687	2,39 R
8	0,00000	1,47222	0,12073	-1,47222	-2,06 R
58	0,00000	1,55909	0,17151	-1,55909	-2,22 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

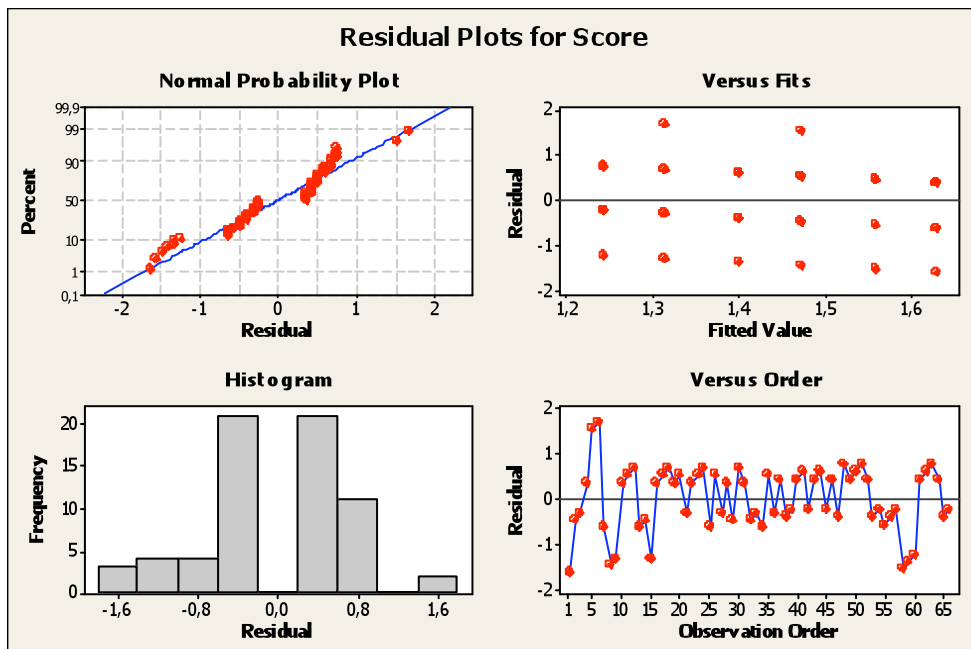
Tukey 95,0% Simultaneous Confidence Intervals
 Response Variable Score
 All Pairwise Comparisons among Levels of Genotype
 Genotype = G subtracted from:

Genotype	Lower	Center	Upper	
N	-0,4301	-0,07222	0,2856	(-----*-----)

-0,40 -0,20 -0,00 0,20

Tukey Simultaneous Tests
 Response Variable Score
 All Pairwise Comparisons among Levels of Genotype
 Genotype = G subtracted from:

Genotype	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
N	-0,07222	0,1791	-0,4033	0,6881



Vedlegg 4d: Statistikk korrelasjon mellom Aggressivitet og Vekstrate fra MiniTAB:

Correlations: R2blsm; 10 C

Pearson correlation of R2blsm and 10 C = 0,139
 P-Value = 0,538

Correlations: R2blsm; 15 C

Pearson correlation of R2blsm and 15 C = 0,124
 P-Value = 0,583

Correlations: R2blsm; 20 C

Pearson correlation of R2blsm and 20 C = 0,141
P-Value = 0,533

Correlations: R2blsm; 25 C

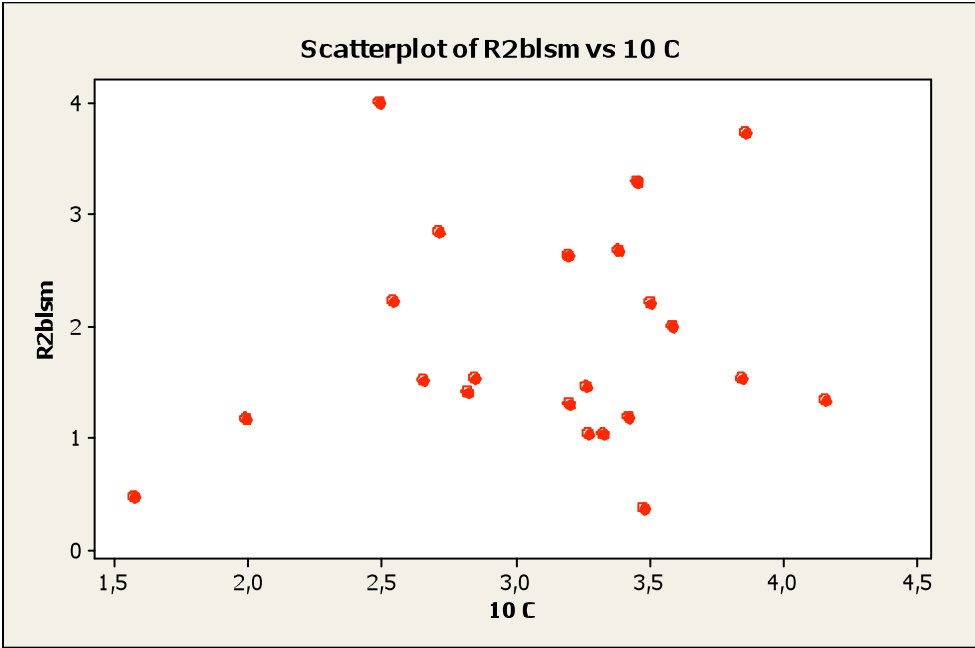
Pearson correlation of R2blsm and 25 C = 0,243
P-Value = 0,277

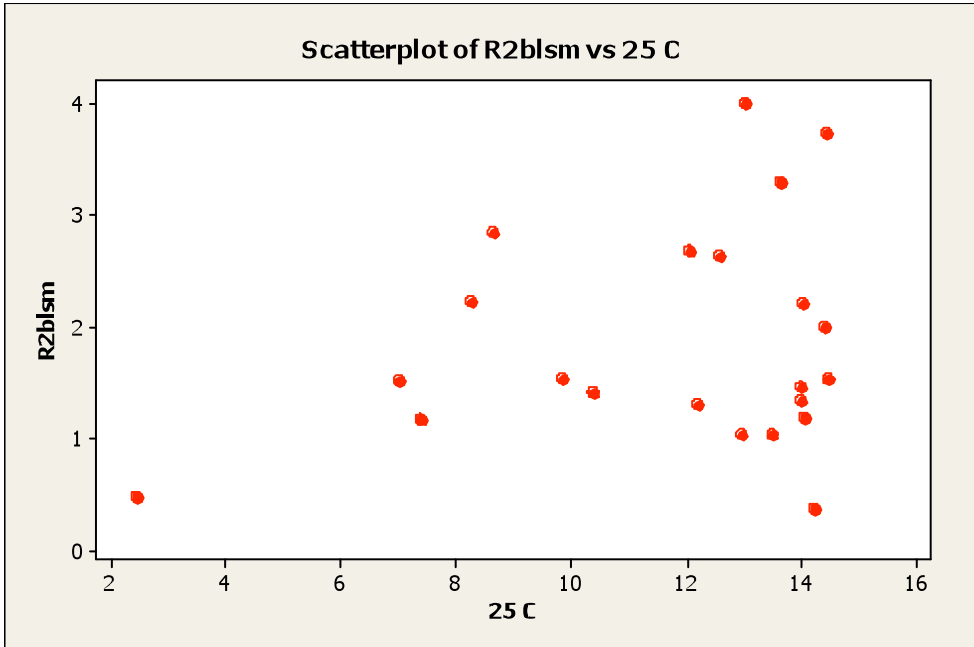
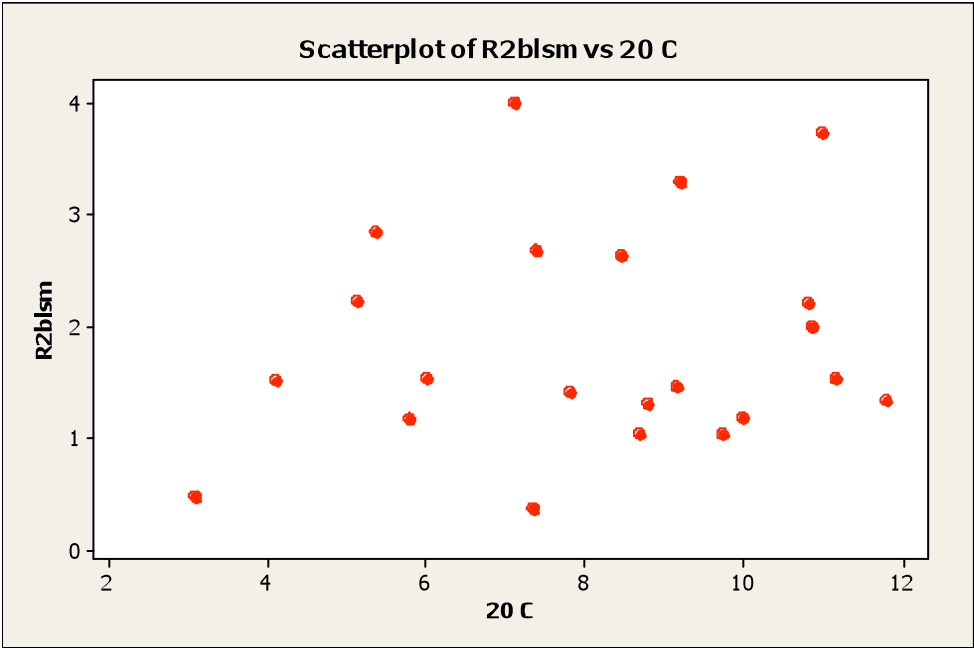
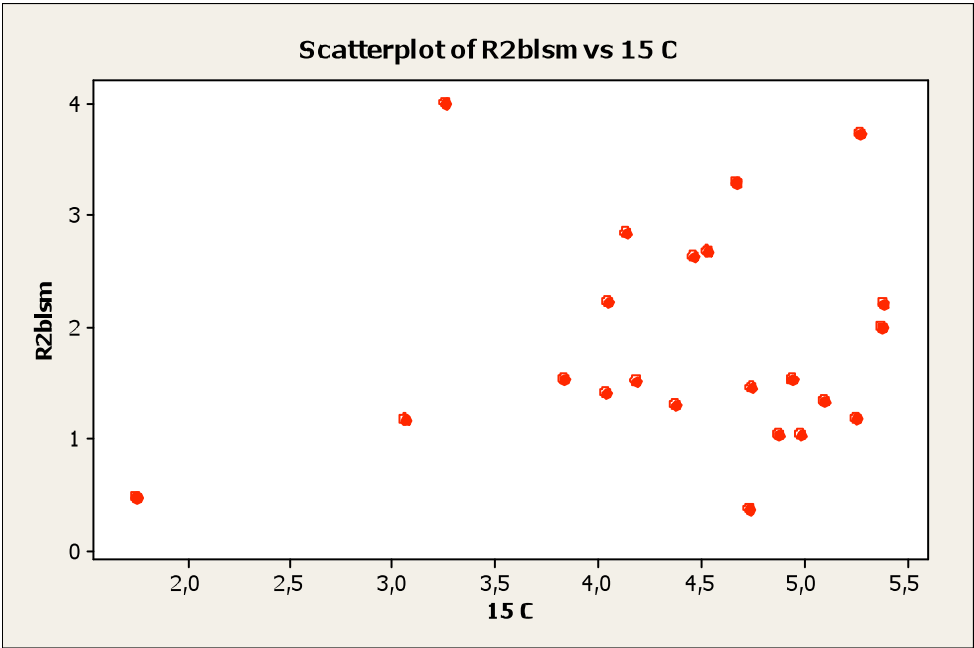
Scatterplot of R2blsm vs 10 C

Scatterplot of R2blsm vs 15 C

Scatterplot of R2blsm vs 20 C

Scatterplot of R2blsm vs 25 C





Vedlegg 4e: Sammenligning perithecieproduksjon mot vekstrate ved korresponderende temperaturer (uten isolat 137/08).

Correlations: 15 C; 15C PER

Pearson correlation of 15 C and 15C PER = 0,227
P-Value = 0,323

Correlations: 20 C; 20C PER

Pearson correlation of 20 C and 20C PER = 0,420
P-Value = 0,058

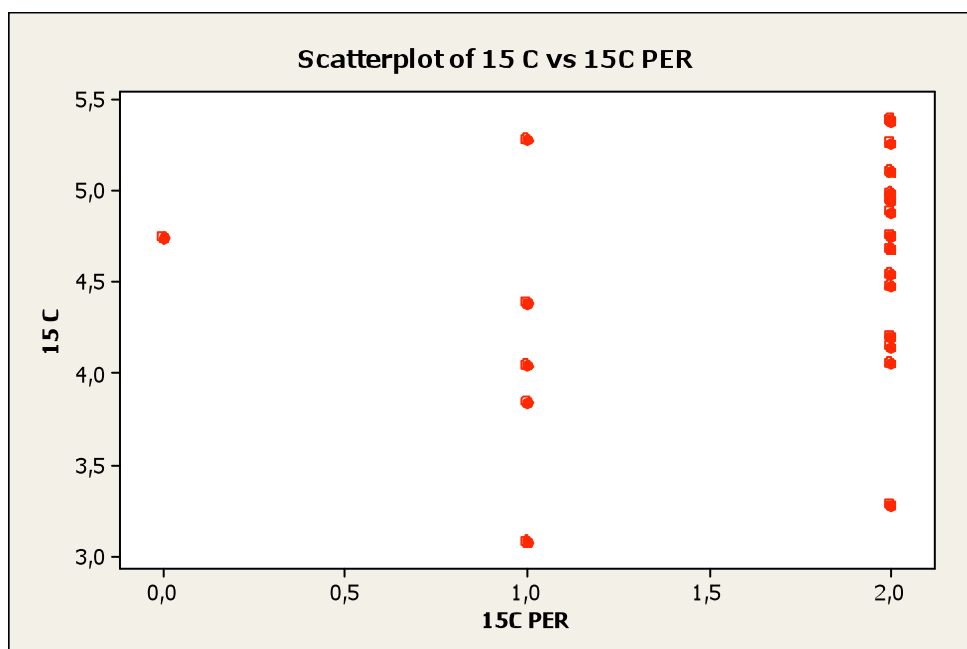
Correlations: 25 C; 25C PER

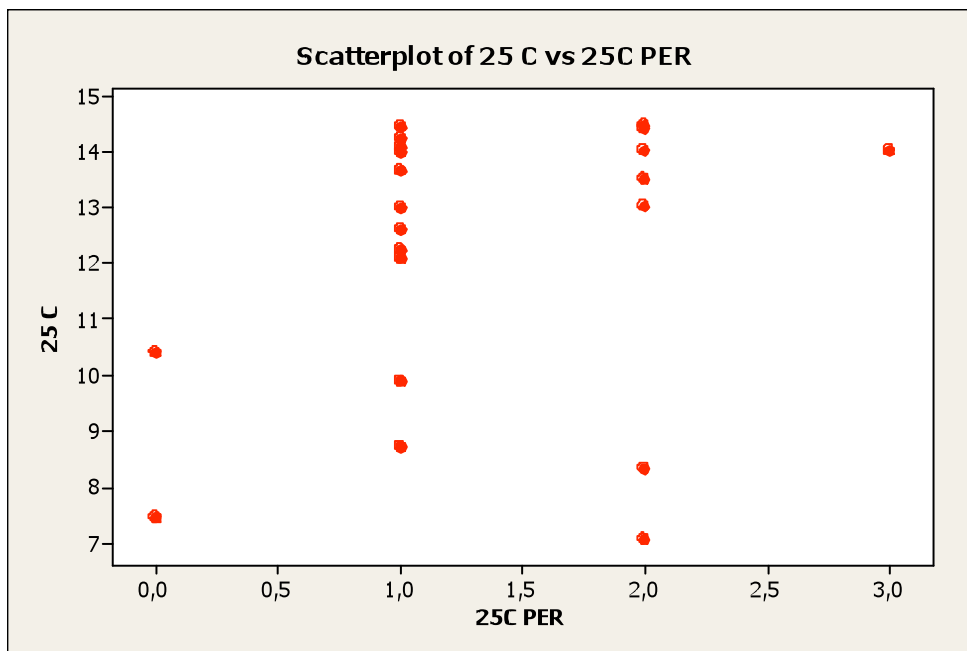
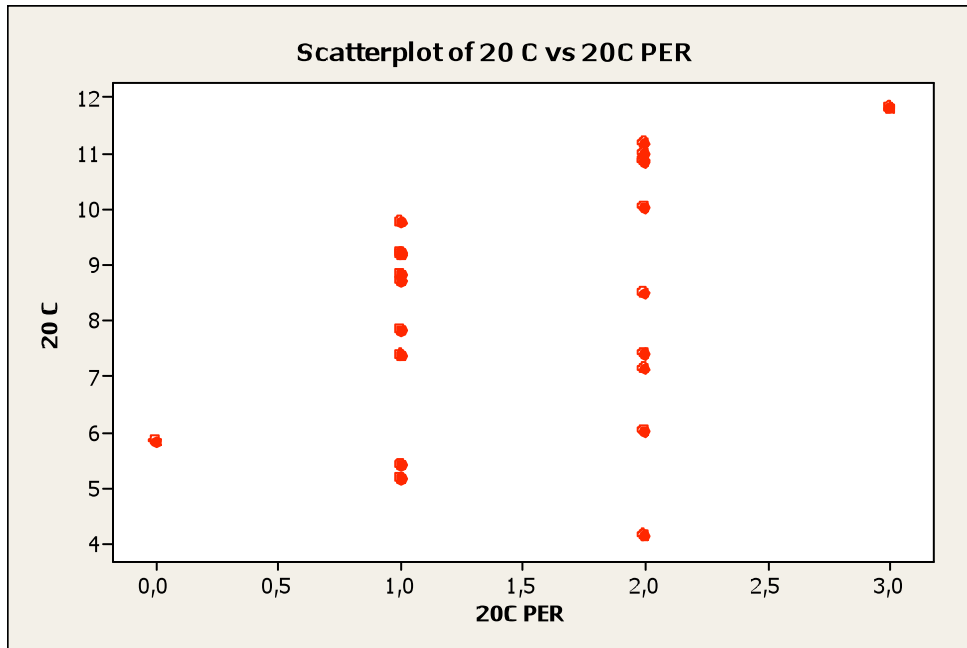
Pearson correlation of 25 C and 25C PER = 0,270
P-Value = 0,236

Scatterplot of 15 C vs 15C PER

Scatterplot of 20 C vs 20C PER

Scatterplot of 25 C vs 25C PER





Vedlegg 4f: Sammenligninger gjennomsnittlig perithecieproduksjon mot vekstrate og aggressivitet (uten isolat 137/08 og 34/08).

Correlations: Perithecier; 25 C; 20 C; 15 C; 10 C

	Perithecier	25 C	20 C	15 C
25 C	0,117 0,623			
20 C	0,296 0,205	0,882 0,000		

15 C	0,215 0,362	0,658 0,002	0,780 0,000	
10 C	0,262 0,265	0,781 0,000	0,870 0,000	0,847 0,000

Cell Contents: Pearson correlation
P-Value

Scatterplot of Perithecier vs R2blsm

Scatterplot of Perithecier vs 25 C

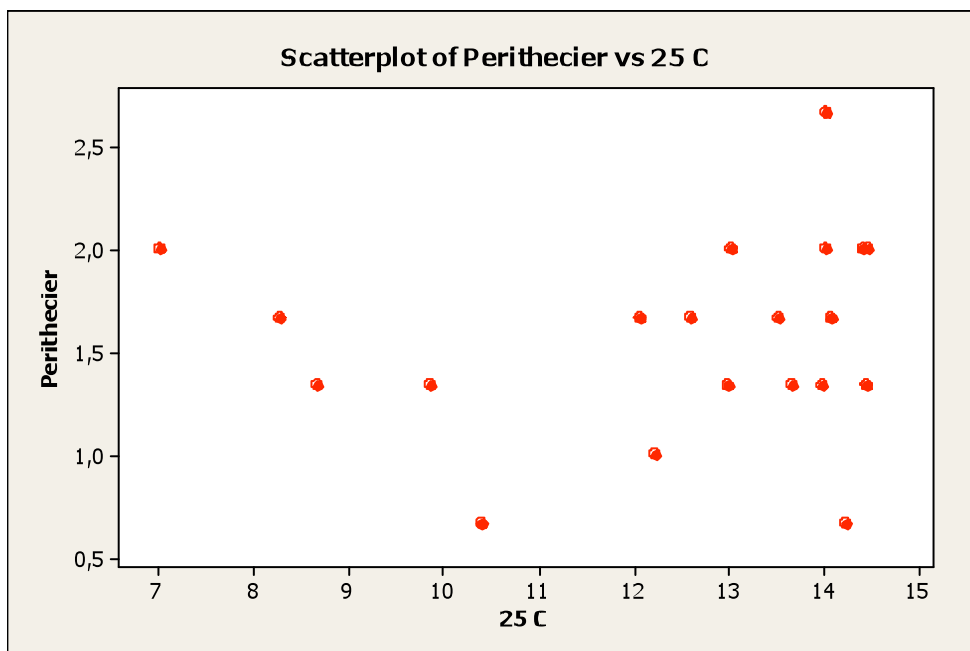
Scatterplot of Perithecier vs 20 C

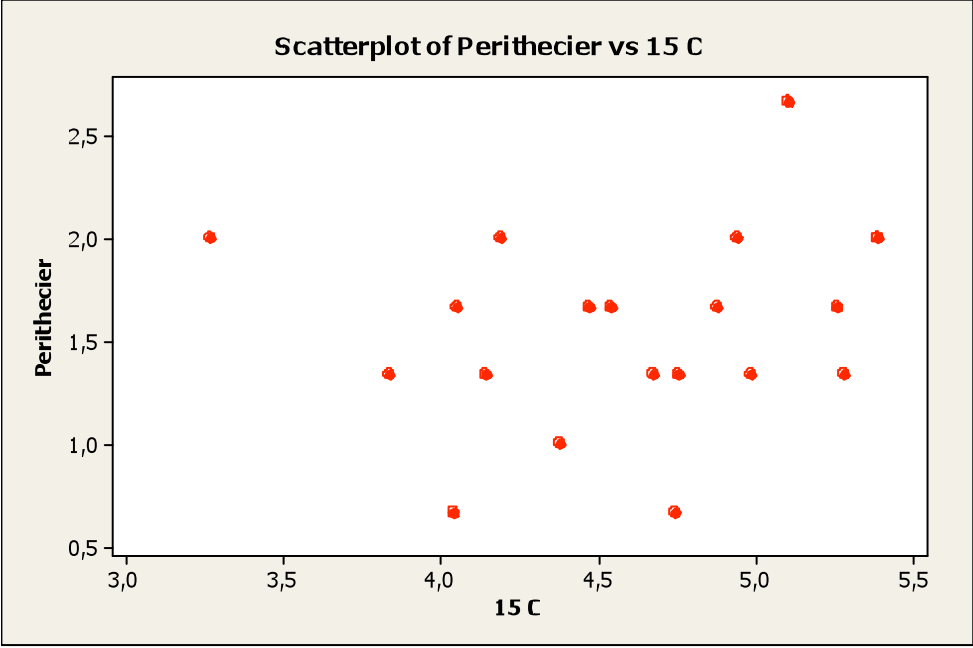
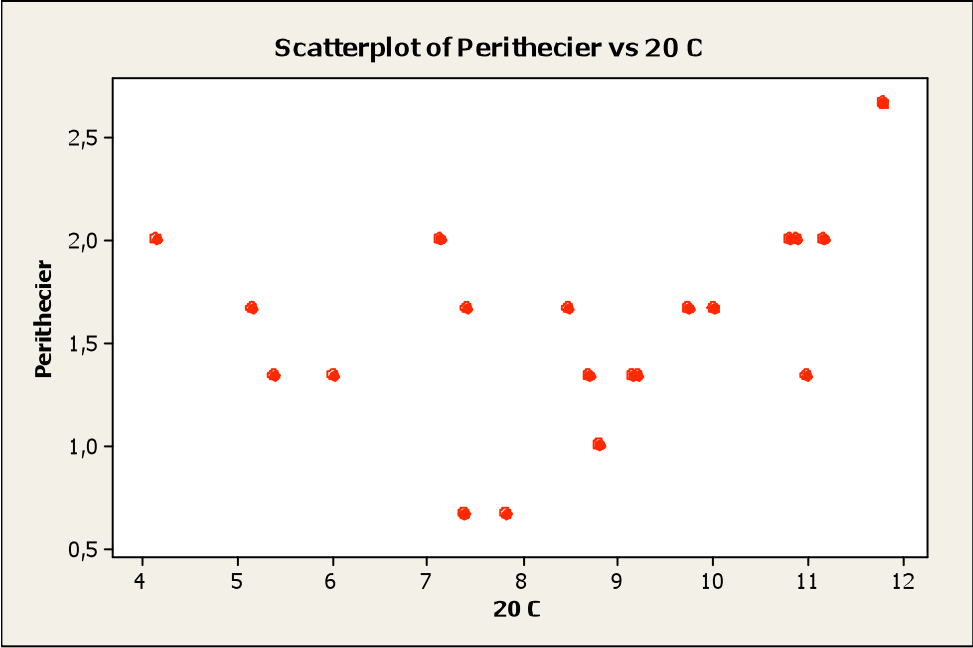
Scatterplot of Perithecier vs 15 C

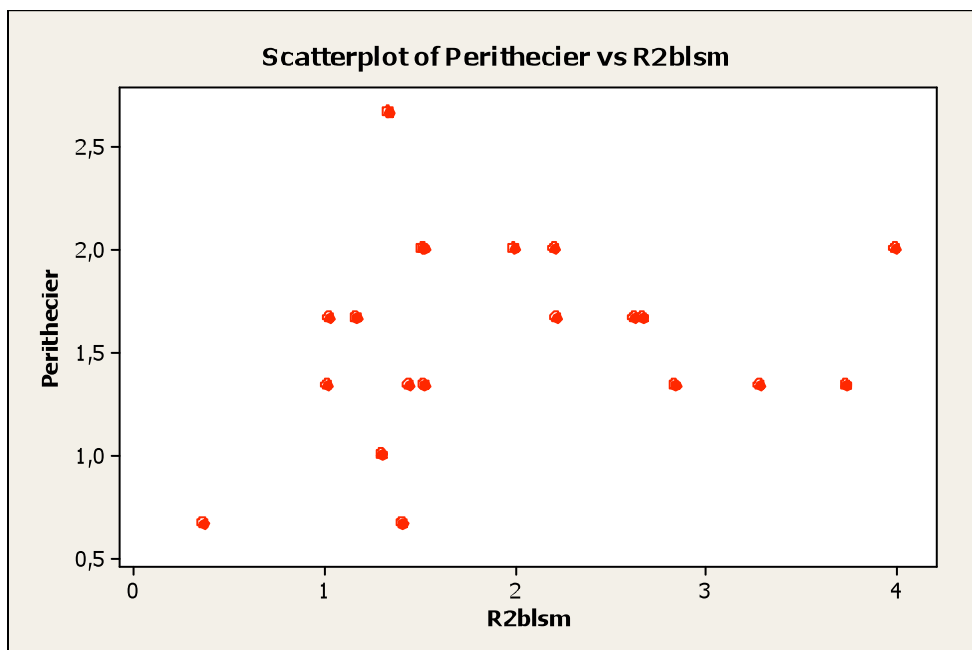
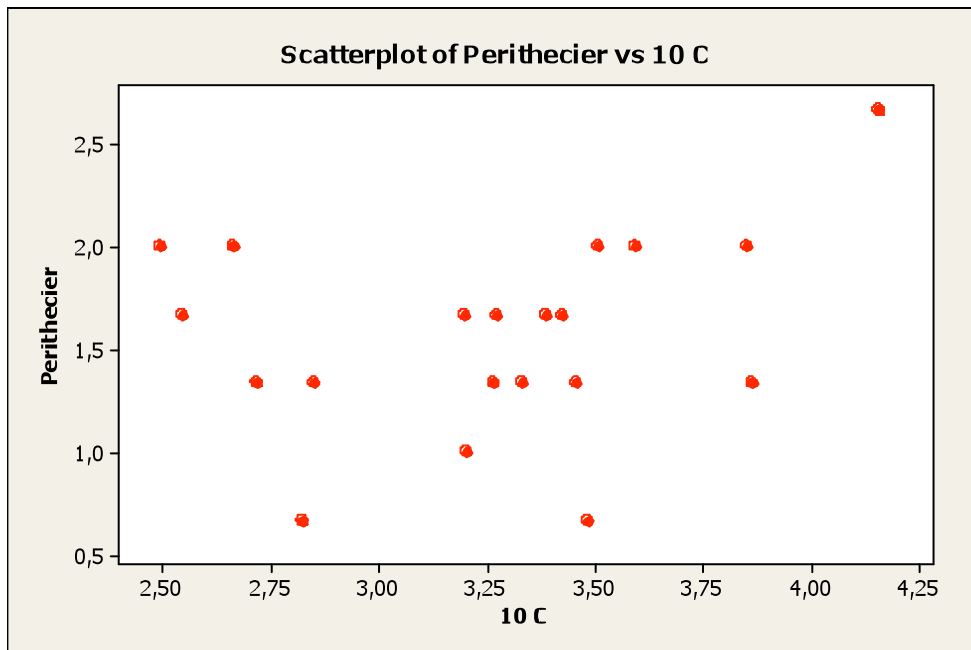
Scatterplot of Perithecier vs 10 C

Correlations: Perithecier; R2blsm

Pearson correlation of Perithecier and R2blsm = 0,195
P-Value = 0,409







Vedlegg 5: Analysetall gjødsel vann

Parameter	Enhet	
Surhetsgrad	pH	6,2
Konduktivitet	mS/cm	1,49
Nitrat	mg NO ₃ -N/L	141
Fosfor	mg/L	23,5
Kalium	mg/L	144
Svovel	mg/L	38,1
Kalsium	mg/L	135
Magnesium	mg/L	24,2
Natrium	mg/L	30,9
Jern	mg/L	0,68
Kobber	mg/L	0,13
Mangan	mg/L	0,33
Zink	mg/L	0,15
Bor	mg/L	0,15
Molybden	mg/L	0,018
Aluminium	mg/L	<0,005
Silisium	mg/L	2,9

Referanser:

- Aamodt, H. e. a. (2008). "Fusarium graminearum in Norwegian Cereals." Journal of Plant Pathology **90**.
- Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. Amsterdam, Elsevier.
- Aoki, T. and K. O'Donnell (1999). "Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*." Mycologia **91**(4): 597-609.
- Bai, G. H., A. E. Desjardins, et al. (2002). "Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes." Mycopathologia **153**(2): 91-98.
- Bai, G. H., R. Plattner, et al. (2001). "Resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat." Plant Breeding **120**(1): 1-6.
- Bai, G. H. and G. Shaner (2004). "Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight." Annual Review of Phytopathology **42**: 135-161.
- Brennan, J. M., B. Fagan, et al. (2003). "Studies on in vitro growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi." European Journal of Plant Pathology **109**(6): 577-587.
- Campbell, K. A. G. and P. E. Lipps (1998). "Allocation of resources: Sources of variation in *Fusarium* head blight screening nurseries." Phytopathology **88**(10): 1078-1086.
- COMMUNITIES, T. C. O. T. E. (2006). "COMMISSION RECOMMENDATION of 17 August 2006 on the prevention and reduction of *Fusarium* toxins in cereals and cereal products." from http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2006/l_234/l_23420060829en00350040.pdf.
- Cumagun, C. J. R., F. Rabenstein, et al. (2004). "Genetic variation and covariation for aggressiveness, deoxynivalenol production and fungal colonization among progeny of *Gibberella zeae* in wheat." Plant Pathology **53**(4): 446-453.
- Delgado, J. A., P. B. Schwarz, et al. (2010). "Trichothecene Mycotoxins Associated with Potato Dry Rot Caused by *Fusarium graminearum*." Phytopathology **100**(3): 290-296.
- Dill-Macky, R. and R. K. Jones (2000). "The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat." Plant Disease **84**(1): 71-76.
- Dufault, N. S., E. D. De Wolf, et al. (2006). "Role of temperature and moisture in the production and maturation of *Gibberella zeae* perithecia." Plant Disease **90**(5): 637-644.
- Elen, O., Hofgaard, I., Brodal, G., Klemsdal, S. & Aamot, H. (2009). Kan vi redusere mykotoksinmengden i korn ved å sprøyte med fungicider? Bioforsk FOKUS. **4**(2): 198-199.
- Eriksen, G. S. and J. Alexander (1998). Fusarium toxins in cereals: a risk assessment. København, Nordisk Ministerråd.
- Gilbert, J., S. M. Woods, et al. (2008). "Germination of ascospores of *Gibberella zeae* after exposure to various levels of relative humidity and temperature." Phytopathology **98**(5): 504-508.

- Henriksen, B. and O. Elen (2005). "Natural Fusarium grain infection level in wheat, barley and oat after early application of fungicides and herbicides." Journal of Phytopathology **153**(4): 214-220.
- Jansen, C., D. von Wettstein, et al. (2005). "Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted Fusarium graminearum." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(46): 16892-16897.
- Khonga, E. B. and J. C. Sutton (1988). "INOCULUM PRODUCTION AND SURVIVAL OF GIBBERELLA-ZEAE IN MAIZE AND WHEAT RESIDUES." Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie **10**(3): 232-239.
- Kosiak, B., M. Torp, et al. (2003). "The prevalence and distribution of Fusarium species in Norwegian cereals: a survey." Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science **53**(4): 168-176.
- Leonard, K. J. and W. R. Bushnell (2003). Fusarium head blight of wheat and barley. Minnesota, APS Press.
- Leslie, J. F. and B. A. Summerell (2006). The Fusarium laboratory manual. Ames, Iowa, Blackwell.
- Ma, L. J., H. C. van der Does, et al. (2010). "Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in Fusarium." Nature **464**(7287): 367-373.
- Miller, J. D. and P. G. Arnison (1986). "DEGRADATION OF DEOXYNIVALENOL BY SUSPENSION-CULTURES OF THE FUSARIUM HEAD BLIGHT RESISTANT WHEAT CULTIVAR FRONTANA." Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie **8**(2): 147-150.
- Muthomi, J. W., E. C. Oerke, et al. (2002). "Susceptibility of Kenyan wheat varieties to head blight, fungal invasion and deoxynivalenol accumulation inoculated with Fusarium graminearum." Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift **150**(1): 30-36.
- Parry, D. W., P. Jenkinson, et al. (1995). "FUSARIUM EAR BLIGHT (SCAB) IN SMALL-GRAIN CEREALS - A REVIEW." Plant Pathology **44**(2): 207-238.
- Paul, P. A., S. M. El-Allaf, et al. (2004). "Rain splash dispersal of Gibberella zeae within wheat canopies in Ohio." Phytopathology **94**(12): 1342-1349.
- Paul, P. A., P. E. Lipps, et al. (2007). "A distributed lag analysis of the relationship between Gibberella zeae inoculum density on wheat spikes and weather variables." Phytopathology **97**(12): 1608-1624.
- Rafoss, T. (2009). Økning i vekstsesongen de siste 20 åra basert på jordtemperatur. Bioforsk FOKUS Bioforsk-konferansen 2009. **4**: 74-75.
- Schaafsma, A. W., L. Tamburic-Ilincic, et al. (2005). "Effect of previous crop, tillage, field size, adjacent crop, and sampling direction on airborne propagules of Gibberella zeae/Fusarium graminearum, fusarium head blight severity, and deoxynivalenol accumulation in winter wheat." Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie **27**(2): 217-224.
- Schroeder HW, C. J. (1963). "Factors affecting resistance of wheat to scab caused by Gibberella zeae." Phytopathology **53**: 831-38.
- Snyder, W. C. a. H. H. N. (1941). "The effect of light on taxonomic characters in Fusarium." Mycologia **33**: 580-591.
- Srobarova, A., A. Moretti, et al. (2002). "Toxicogenic Fusarium species of Liseola section in pre-harvest maize ear rot, and associated mycotoxins in slovakia." European Journal of Plant Pathology **108**(4): 299-306.

- Tamburic-Ilicic, L., D. Gaba, et al. (2008). "Chemotypes of *Fusarium graminearum* isolates and accumulation of deoxynivalenol (DON), 15-ADON and 3-ADON in naturally infected and inoculated winter wheat in Ontario, Canada." Cereal Research Communications **36**: 623-624.
- Waalwijk, C., P. Kastelein, et al. (2003). "Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands." European Journal of Plant Pathology **109**(7): 743-754.
- Walker, S. L., S. Leath, et al. (2001). "Variation among isolates of *Fusarium graminearum* associated with *Fusarium* head blight in North Carolina." Plant Disease **85**(4): 404-410.
- Wang, Y. Z. (1997). Epidemiology and management of wheat scab in China. Fusarium head scab: global status and future prospects. L. G. H.J. Dubin, J. Reeves & A. McNab.
- Wang, Y. Z. and J. D. Miller (1988). "EFFECTS OF FUSARIUM-GRAMINEARUM METABOLITES ON WHEAT TISSUE IN RELATION TO FUSARIUM HEAD BLIGHT RESISTANCE." Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift **122**(2): 118-125.
- Wanyoike, M. W., F. Walker, et al. (2002). "Relationship between virulence, fungal biomass and mycotoxin production by *Fusarium graminearum* in winter wheat head blight." Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection **109**(6): 589-600.
- Wiese, M. V. (1987). Compendium of wheat diseases. St. Paul, Minn., APS Press.
- Xu, X. M., W. Monger, et al. (2007). "Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal biomass and mycotoxin concentrations on wheat inoculated with single, or combinations of, *Fusarium* species." Plant Pathology **56**(6): 943-956.
- Xu, X. M. and P. Nicholson (2009). "Community Ecology of Fungal Pathogens Causing Wheat Head Blight." Annual Review of Phytopathology **47**: 83-103.
- Xu, X. M., P. Nicholson, et al. (2008). "Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* head blight of wheat and environmental conditions." Phytopathology **98**(1): 69-78.
- Xu, X. M., D. W. Parry, et al. (2005). "Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries." European Journal of Plant Pathology **112**(2): 143-154.
- Yli-Mattila, T. (2010). "ECOLOGY AND EVOLUTION OF TOXIGENIC FUSARIUM SPECIES IN CEREALS IN NORTHERN EUROPE AND ASIA." Journal of Plant Pathology **92**(1): 7-18.