

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



## Forord

Denne oppgaven er en avslutning av masterstudiet mitt i Plantevitenskap ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap på Ås. Temaet var foreslått av forsker Venche Talgø, og Arne Stensvand ved Bioforsk Plantehelse på Ås. Denne oppgaven valgte jeg fordi jeg ønsket å videreutvikle min kunnskap om plantepatologi. Arbeidet ble utført ved Bioforsk Plantehelse, Ås i 2011.

Jeg vil spesielt takke min veileder Venche Talgø, som hjalp meg gjennom arbeidet. Jeg vil også takke alle som har bidratt; Guro Brodal, Håvard Eikemo, Trude Slørstad, Andrew Dobson, Grete Lund, May Bente Brurberg og Erling Fløistad ved Bioforsk Plantehelse, personalet ved Kimen Såvarelaboratorium i Ås, Heidi Røsok Bye fra Skogfrøverket i Hamar.

Universitetet for Miljø- og Biovitenskap, Ås, 15.12.2011

---

Eleonora Høst

# Innhold

<b>Forord</b> .....	<b>1</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>3</b>
<b>Summary</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Innledning</b> .....	<b>7</b>
<b>2. Juletreproduksjon</b> .....	<b>7</b>
2.1 Juletrearter.....	8
2.2 Dyrkningsdistrikt.....	10
2.3 Sykdommer på juletrær .....	11
2.4 Frøoverførte sopper .....	19
2.4.1 Generelt .....	19
2.4.2 Hvordan patogen infiserer frø.....	21
2.4.3 Frøoverførte sopper som kan være problematiske på juletrær.....	21
2.4.4 Sekundære sopper .....	22
2.5 Kochs postulater .....	23
Eget forsøk:	
<b>3. Materialer og metoder</b> .....	<b>23</b>
3.1 Frø til beiseforsøk.....	23
3.2 Frøbehandling (beising).....	23
3.3 Analyse for frøoverførte sopper .....	26
3.4 Spiretesting av frøene .....	27
3.5 Statistikk .....	28
3.6 Smitting av trær for å fullføre Kochs postulater .....	28
3.7 DNA analyse til identifisering av sopper.....	33
<b>4. Resultater</b> .....	<b>34</b>
4.1 Resultater av soppvekst og spireprosent etter de ulike frøbehandlingene.....	34
4.2 Smitteforsøk.....	38
<b>5. Diskusjon</b> .....	<b>40</b>
<b>6. Konklusjon</b> .....	<b>43</b>
<b>7. Litteraturliste</b> .....	<b>44</b>
<b>8. Vedlegg 1-4</b> .....	<b>49</b>

## Sammendrag

Norsk juletreproduksjon har de siste årene hatt sterk økning. Det har også ført til uforutsette problemer, da produksjonen i stor grad har skiftet fra vanlig gran (*Picea abies*) til edelgran (*Abies* spp.). Dette har ført til at nye skadegjørere har blitt introdusert. Det er spesielt sopp sykdommer som går ut over kvaliteten på juletrærne. Edelgran artene dyrkes stort sett i områder på sørvestlandet på grunn av passende klima, et klima som dessverre også er gunstige for mange patogene sopper; fuktig og mildt. Handel med plantemateriale og frø fører med seg skadeorganismer som ikke hører naturlige hjemme på stedene trærne blir plantet. Blant annet gjør soppen *Sydowia polyspora*, som er frøoverført og derfor kan følge småplantene, stor skade i mange juletreplantasjer. Den fører til nåledryss og døde skudd.

I denne oppgaven presenteres først de vanligste juletreartene og sopp sykdommene de kan angripes av. Deretter er det fokus på frøoverførte sopper og beiseforsøk mot disse. Spesielt *S. polyspora* får bre omtale i oppgaven, da denne soppen var grunnlaget for at forsøkene ble satt i gang. Målet var å komme frem til en beisemetode som var effektiv mot soppene samtidig som frøene beholdt spireevnen. Et frøparti av nobeledelgran (*Abies procera*) og et av alpefuru (*P. mugo* var. *rotundata*) ble valgt ut siden de i tidligere forsøk hadde vist stort innhold av *S. polyspora*. Frøene fikk ulike typer behandlinger med kjemiske og biologiske midler; eddiksyre, Signum (fungicid), Mycostop (biologisk preparat), timianolje og overflatesterilisering (etanol og hypokloritt). Vi ville finne ut hvilke sopper som eventuelt overlevde de ulike behandlingene.

Både på edelgranfrøene og furufrøene var det stor variasjon mellom de forskjellige beisemetodene. Timianoljen var veldig effektivt mot soppvekst, men det ødela spireevnen. Signum og eddiksyre hadde begge god effekt mot *S. polyspora* og andre sopper uten å redusere spireevnen. Mot *S. polyspora* hadde Signum klart best effekt av de to sistnevnte midlene. *S. polyspora* ble ikke eliminert med overflatebehandling, noe som tyder på at soppen også fins inni frøene. Den gode effekten av Signum kan derfor trolig tilskrives den systemiske virkemåten til dette fungicidet.

Et isolat av *S. polyspora* fra ubehandlet kontroll av nobeledelgranfrø ble brukt til å smitte småplanter av to edelgranarter for å undersøke om det var patogent, en såkalt patogenitetstest. To år gamle pluggplanter av fjelledelgran (*Abies lasiocarpa*) og nordmannsedelgran (*A. nordmanniana*) ble brukt i forsøket. Tre ulike smittemetoder ble benyttet like etter at trærnes skudd begynte å bryte, altså før det beskyttende vokslaget hadde utviklet seg på nålene. Den første smittemetoden gikk ut på å pensle skuddene med sopp sporesuspensjon uten å søre på forhånd. I den andre metoden ble en knippe nåler nappet bort på skuddet før pensling av nålefestet med sopp sporesuspensjon. Den siste metoden gikk ut på å dyppe autoklaverte kartnåler i soppkulturen og deretter sette de inn rett under knopper som var i ferd med å bryte. Smitteforsøket viste at det bare var en av smittemetodene som førte til tydelige

symptomer (visne skudd). Det var metoden der infiserte kartnåler ble satt inn under knopper på fjelledelgran.

Det ble også foretatt sekvensering av noen uidentifiserte sopper fra furufrøene, i alt 13 isolater. Et overraskende resultat fra sekvenseringen var funn av rotkjuke (*Heterobasidion* sp.), et svært vanlig patogen i norske skoger. I USA er dette en vanlig skadegjører i juletreplantasjer, og kan etter hvert komme til å bygge seg opp og bli problematisk i norske juletrefelt.

## Summary

The Norwegian Christmas tree production has in recent years experienced strong growth. It has also led to unforeseen problems, since the production has largely shifted from spruce (*Picea abies*) to fir (*Abies* spp.). This has further led to introduction of new pests and diseases. Especially fungal diseases affect the quality of Christmas trees. Due to suitable climate, fir species are mainly grown in the southwestern areas of the country, a climate which unfortunately also is favorable for many pathogenic fungi; wet and mild. Trade with plant material and seeds may introduce damaging organisms not native to the places the trees are planted. For instance *Sydowia polyspora*, which is seed borne and therefore may follow the transplants, causes great damage in many Christmas tree plantations. It leads to needle cast and dead shoots.

Here we first present the most common Christmas tree species and the fungal diseases they may be infested by. Then the focus is on management of seed borne fungi by different seed treatments. In particular, *S. polyspora* has a central role since this fungus was the main reason for carrying out the experiments. The goal was to reach an effective method for seed treatment. A seedlot of noble fir (*Abies procera*) and one of mountain pine (*P. mugo* var. *rotundata*) were selected since it was known from previous experiments that they had a high amount of *S. polyspora*. The seeds got different types of treatments with chemical and biological agents; acetic acid, Signum (fungicide), Mycostop (biological) thyme oil and surface sterilization (ethanol and hypochlorite). The effect of the different treatments varied considerable both on fir and pine seeds. Thyme oil had full effect against fungal growth, but destroyed the germination of the seeds. Signum and acetic acid had also good effect against *S. polyspora* and other fungi, and they did not reduce the germination percent. Surface sterilization reduced the amount of *S. polyspora*, but did not eliminate it, thus indicating that the fungus must also be present inside the seeds. Signum being a systemic fungicide may explain the good effect it had against *S. polyspora*, that is killing the fungus both on the seed surface and inside of the seeds.

An isolate of *S. polyspora* from untreated control of noble fir seeds was used in an inoculation test to investigate whether or not it was pathogenic. Two year old plug plants from subalpine fir (*Abies lasiocarpa*) and nordmann fir (*A. nordmanniana*) were inoculated immediately after the buds started to break, before the protective wax layer had developed on the needles. Three different inoculation methods were used. The first method was to apply fungal spore suspension to the new shoots with a soft paintbrush. In the second method the shoots were wounded by pulling out 5 needles before applying the spore suspension like in method one. The last method was to dip autoclaved map pins in the fungal culture and insert them just below buds that were about to break. The infection trials showed that only the last method led to obvious symptoms (necrotic shoots).

DNA sequencing was carried out on some unidentified fungi from the pine seed test. A surprising result was discovery of annosus root rot (*Heterobasidion* sp.), a very common pathogen in Norwegian forests. In USA, this is a common pest in Christmas tree plantations, and may also become problematic in Norwegian Christmas tree plantations.

## 1. Innledning

Norsk juletreproduksjon har de siste årene hatt stor vekst. Før i tiden ble trærne hentet rett fra skogen, men etter hvert som interessen økte ble det mer og mer vanlig å produsere juletrær i egne juletrefelt på dyrket mark (Anonym 2011d). Totalt blir det hver jul omsatt i overkant av 1,6 millioner trær her i landet. Det stilles store krav til høy kvalitet på norskproduserte juletrær, da konkurransen fra utlandet er stor. Krav som i stor grad har blitt innfridd, da importen fra Danmark har blitt redusert fra en halv til en kvart million trær det siste tiåret. Det har også blitt etterspørsel etter norske juletrær i Europa. Tidligere var vanlig gran (*Picea abies*) mye brukt som juletre, men i dag er det edelgran (*Abies* spp.) som dominerer markedet, både nasjonalt og internasjonalt. Den økende populariteten skyldes edelgranens gode nålefasthet, aromatiske lukt, farge og form. Edelgranen er krevende i forhold til klima og jordsmonn. Den trives spesielt godt i varmt og litt fuktig klima, og på godt utviklet brunjord (Nygaard 2009) der det er stor biologisk aktivitet.

I Norge foregår størstedelen av edelgranproduksjonen på sørvestlandet hvor klimaet er gunstig; mildt og fuktig. Dette klimaet er dessverre også ideelt for sykdomsangrep. Ikke minst gjør en rekke sopper stor skade (Talgø 2009). Norsk forskning har vist at noen av soppene på bartre er frøoverførte, spesielt *Sydowia polyspora* (Bref. & Trv.) E. Müller (Talgø *et al.* 2010a). Denne soppen fører både til flekker på årsnålene (CSNN/current season needle necrosis) og døde årsskudd (*Sclerophoma*-skade) (Talgø *et al.* 2010b)

Hovedmålsettingen med denne oppgaven var å finne frem til effektive beisemetoder mot *S. polyspora* og andre frøoverførte sopper, men også å sette seg inn i hvordan man isolerer sykdomsorganismene, identifiserer dem og gjennomfører smitteforsøk. For å få innsikt i juletreproduksjonen og de utfordringene næringen står overfor på sykdomssiden, begynner oppgaven med en generell orientering om juletrearter og hvilke sykdommer de er utsatt for, med spesielt fokus på de frøoverførte soppene.

## 2. Juletreproduksjon

I Europa er det relativt få klimatiske gunstige områder for edelgranproduksjon, men takket være Golfstrømmen har kyststrøkene i Sør-Norge gode forutsetninger for å produsere trær av høy kvalitet. I Europa er det spesielt stor produksjon i Danmark, men også land som Tyskland, Frankrike og Storbritannia produserer edelgran (Skage 2009). Enkelte av treartene er vi nesten alene om å produsere, som fjelledelgran (*A. lasiocarpa*). Ellers er gran (*Picea* spp.) og i liten grad furu (*Pinus* spp.) dyrket som juletrær. I tidligere tider ble også eier og kristtorn brukt som juletrær enkelte steder i landet (Pundsnes 2011). Av treartene som produseres til juletrær i Norge er 80 % av dem edelgran (Anonym 2011d).



Trærne går både til juletremarkedet og som pyntegrønt til blomsterbutikker og binderier. Eksporten går hovedsakelig til England og Tyskland (Hauge 2011). Eksporten dreier seg om 50-100 000 trær årlig. Grunnen til at vi har eksport samtidig som vi importerer skyldes at man i andre land etterspør andre kvaliteter enn de smale trærne de fleste nordmenn ønsker. Dette er dessuten svært attraktivt for produsentene siden eksporten foregår før den krevende arbeidsstoppen den innenlandske omsetning innebærer.

## 2.1 Juletrearter

I hovedsak er det nordmannsedelgran (*A. nordmanniana*), fjelledelgran og vanlig gran som blir produsert som juletrær i Norge. Noen få dyrkere har små arealer av koreaedelgran (*A. koreana*), sibiredelgran (*A. sibirica*), fraser edelgran (*A. fraserii*), engelmansgran (*A. engelmannii*), serbergran (*P. omorica*) og andre trearter som juletrær. Nobeledelgran (*A. procera*) brukes først og fremst som pyntegrønt. I Danmark er det hovedsakelig nordmannsedelgran som blir produsert som juletre, og de har store områder med nobeledelgran til pyntegrønt.

Opprinnelsen til de ulike juletrærne er svært forskjellig. De er alle utbredt over den nordlige halvkule, der klimaet er temperert. Ingen edelgranarter har opprinnelse fra Norge eller Skandinavia, men noen har forvillet seg (Storheim 1997), særlig vanlig edelgran (*A. alba*), men denne arten blir ikke brukt som juletre. Trær som ikke er tilpasset klimaet de blir plantet i kan lett komme til skade på grunn av abiotiske (frost, tørke o.a.) og biotiske (sopp sykdommer, insektskade o.a.) faktorer. Generelt har trær med stort utbredelsesområde der de opprinnelig kommer fra, størst mulighet til å tilpasse seg nye dyrkingsområder, da det vil være flere klimaområder å sanke frø fra, altså ulike provenienser (klimarasene). Klimarasene har gjennom naturlig utvalg utviklet tilpassning til klimaet de lever under.

Vanlige kjennetegn på edelgran er de markante spalteåpningene på nålene. Noen edelgranarter har spalteåpninger både på over- og undersiden av nålene. Konglene peker, i motsetning til på gran, oppover, og når konglene faller av, står konglefoten (innmaten) igjen på greinen (Storheim 1997). Det som gjør edelgran til et bra juletre er den gode nålefastheten. Den gode nålefastheten skyldes at nålene hos edelgran sitter enkeltvis på et bladfeste, mens nålene hos gran alltid sitter festet til et lite bladskaft som fester nålen til kvisten (Sandved *et al.* 1998). Når granen er utsatt for tørke vil denne stilken lett brette og nålene vil da drysse lett av (Anonym 2011c).

**Fjelledelgran** har stor utbredelse i fjellområdene ved Rocky Mountains i vestlige deler av Nord-Amerika. Den er hardfør og er et typisk fjelltre, der den vokser sakte. Krona er tett, smal og spiss og har blekt, blågrønt bar med spalteåpninger på begge sider av nålene. Fjelledelgran er utsatt for vårfrost og

angripes lett av sibirsk edelgranlus. Arten blir mest brukt for produksjon i innlandet og i høyereliggende strøk.

**Nordmannsedelgran** (Figur 1) har opprinnelsesområde i Kaukasus, med forskjellige proveniensområder som strekker seg fra sydlige Russland (Svartehavskysten), Georgia og til nordlige Tyrkia (Skage 2007). Baret er blankt og mørkegrønt. Nålene har to karakteristisk brede, hvite striper på undersiden, og et hakk i spissen. Den brukes til juletre og pyntegrønt. Bortsett fra de første årene vokser treet raskt, og må reguleres. Arten er utsatt for barfrost og roten tåler ikke mange minusgrader (Skage 2007). Nordmannsedelgran bør helst dyrkes i nedbørrike kyststrøk på Sør- og Vestlandet (Storheim 1997). Det er store forskjeller i provenienser med hensyn til hardighet og motstandskraft mot skadegjørere.



Figur 1. Nordmannsedelgran (*Abies nordmanniana*) i et forsøksfelt ved Bioforsk på Ås, Akershus 24. oktober 2011. Foto: Eleonora Høst.

**Nobeledelgran** har også opprinnelsesområde i høyereliggende strøk langs kysten i vestlige deler av Nord-Amerika. De grenser opp mot fjelledelgran skogen og i grensebeltet krysses de to artene ofte med hverandre. Nobeledelgranen trives best i vintermilde kyststrøk, da den er utsatt for klimaskader. Baret er blågrønt/blågrått og tett, holder godt på nålene og blir mye brukt til pyntegrønt. Den har som fjelledelgran spalteåpninger på begge sider av nålene. Planter av nobeledelgran kan være vanskelig å etablere, ofte på grunn av uttørking (Storheim 1997). Derfor må forholdene være riktige fra starten av. Det er store forskjeller i provenienser.

**Sibirsk edelgran** har god nåleholdbarhet og kan stå lenge i romtemperatur uten å drysse, men blir lite brukt som juletre fordi greinene er litt myke og bøyer seg lett når trærne blir pyntet.

**Fraseredelgran** er en ny art i Norge, som det har blitt dyrket lite av. Opprinnelsesområdet er i fjellkjeden Blue Ridge Mountains i sørvestlige Nord-Amerika. De vokser hurtig og må, som flere edelgranarter, toppskuddreguleres. Trærne har frisk grønn farge. Dårlig vinterherdighet og insektangrep gjør de uegnet på Østlandet (Skage *et al.* 2007).

**Koreaedelgran** er et tre som er velegnet til juletreproduksjon, men det har en tendens til sette kongler i svært ung alder. Dette er problematisk fordi kongleskjellene faller av før jul slik at bare konglefoten står igjen. Dette er skjemmende selv om treet har god nåleholdbarhet og friskt grønt bar med sølvfarget underside.

**Vanlig gran** var i tidligere tider den juletrearten som var mest brukt som juletre. Man hugget det direkte i skogen. Arten har blitt mindre populær etter edelgranens fremmarsj. Den drysser lett innendørs, men har god aromatisk duft. Mange foretrekker likevel denne arten da den er mer forbundet med den norske juletradisjonen. Granen dyrkes stort sett over hele landet, utenom de ytterste kyststrøk.

**Engelmansgran** har opprinnelse i de vestlige delene av Nord-Amerika, der den vokser mellom 1500 og 3800 m.o.h. Det er et smalt, tett og kjegleformet tre som holder bedre på nålene enn vanlig gran. Det er en spesiell, sterk lukt av baret som mange oppfatter som ubehagelig og engelmansgran er derfor litt vanskelig å omsette. Farge på baret varierer fra blått via blågrønt til grønt, med hvite spalteåpningbånd på begge sider av nålene. Arten skyter tidlig på våren, og er ømfintlig for vårfrost. Engelmansgran er brukt i fjellskog i Norge, men i liten skala.

**Serbergran** ligner litt på edelgran på grunn av den sølvaktige fargen. Den holder bedre på nålene enn vanlig gran og er et populært juletre på grunn av den smale vekstformen. Dens myke greiner gjør at det blir vanskelig å bære pynt og lys.

## 2.2 Dyrkningsdistrikt

I Norge er det i Rogaland mesteparten av juletreproduksjonen foregår. Hele 40 % av det tilplantede arealet ligger der (Anonym 2011d). Nordmannsedelgran dominerer i Rogaland, men stadig mer fjelledelgran blir også plantet i høgereliggende strøk. Gran og fjelledelgran dyrkes spesielt på Østlandet og nordvestlandet til og med Trøndelag, altså i områder der klimaet er mindre gunstig for nordmannsedelgran.

### 2.3 Sykdommer på juletrær

Større satsning på dyrking av fremmede arter har vist at man står overfor nye problemer med produksjonen, blant annet insekter og sykdommer. Behovet for kunnskap for å kunne identifisere disse skadegjørerne, og dermed kontrollere eller bekjempe dem, er stort, men litteratur og informasjon på området er ofte mangelfull.

Hvert år ødelegges arealer med tilplantede juletrær som følge av abiotiske og biotiske skader. Til sammen er det bare ca. 50-60 % av alle trær plantet til juletreproduksjon, som oppfyller kravet til salgskvalitet (Talgø & Stansvand 2005). Det er flere årsaker til at store mengder trær går ut. I hovedsak skyldes problemet angrep av ulike sopp sykdommer (Talgø 2009), men noe skyldes dårlig klimatilpassning som gjør trærne utsatt for vårfrost og vinterfrost. Utvalg av riktig proveniens er derfor svært viktig for å forebygge skader. Feil proveniens valg dvs provenienser som er flyttet for langt syd eller nord, kan gi frostskafer (Anonym 2011b), på grunn av at de ikke er tilpasset sesongavslutning. Mangelfull klimatilpassning eller mistriksel av andre grunner kan svekke resistensen mot ulike sopp sykdommer (Solbraa 2001). Ved etablering av plantasjer for frøavl, er det også viktig at det innplantede materialet er sykdomsfritt og av høy kvalitet (Singh 1996).

Feil i gjødslingsforhold kan også gjøre trærne mer utsatt for sopp sykdommer (Sæbø & Pundsnes 2009). Sopper kan også lett komme inn etter mekaniske skader på trærne. I et kvalitetsforsøk som Skog og landskap gjorde i 2010, hadde edelgranartene som var plantet i forsøket, høy andel mekaniske skader forårsaket av ulike faktorer (Nyeggen *et al.* 2010).

Juletefelt som er anlagt på tidligere skogsmark, spesielt eldre granfelt, kan ha skadegjørere i området som kan være smittekilde, blant annet honningsopp (*Armillaria* spp.). Mye nordmannsedelgran blir importert som barrotplanter fra Danmark, noe som blant annet har ført med seg *Phytophthora* sp. (Talgø *et al.* 2007), en jordboende skadeorganisme som angriper røttene, og dermed dreper treet.

Det tar 7-10 år avhengig av arten, før man kan selge juletrærne, og 10-12 år før man kan høste baret til pynt. Det er store krav til at baret eller trærne er frie for skader som misfargede nåler, algebelegg, insektskader og døde nåler (Jansen 1993). Størsteparten av skadene på edelgran skyldes sopp sykdommer som angriper nålene, og gjør dem lite attraktive på markedet.

Edelgranen er også ganske utsatt for skader som feiling og beiting av hjort, elg og rådyr (Storheim 1997), og juletefeltene må derfor gjerdes inn i utsatte områder. Skadene kan også bli viktige inngangsporter for skadegjørere som sopp.

Trær som blir plantet steder som ikke er lik opprinnelsesområdet (fysisk, biologisk, økologisk), kan bli verter for ulike organismer som ikke finnes i opprinnelsesområdet. Det kan være at de evolusjonært ikke har bygget opp et naturlig forsvar mot organismene fordi de er ukjente for plantene. Når fremmende trearter plantes eller flyttes til områder der de ikke har eksistert før, kan også deres opprinnelige skadegjørere følge med (Skage 2011) og utgjøre en trussel mot ikke resistente lokale arter (Anonym 2007). I et klima som er gunstig for skadeorganismen, er sjansen stor for at organismen formeres raskt på en vert som ikke har forsvar mot den.

Sykdommer kan spres med frø og plantemateriale, luft/vind og med jord/vann. Sykdommer som går på nåler og skudd er hovedsakelig luftbårne. De jordbårne er som regel de som infiserer rot og rothals, slik som *Phytophthora* spp.

Videre deler man ofte ulike typer soppsykdommer som angriper bartrær i disse kategoriene (Callan 2001):

- Bladflekksykdommer
- Nålefallsykdommer
- Kongle, frø og frøplantesykdommer
- Kreftsårsykdommer
- Rotråte
- Blåfarging av treverk
- Ulike slag oomyceter
- Rustsopper
- Sykdommer som angriper ved hjelp av hattsopper eller kjuker (nedbrytere)

Noen sopper kan angripe spirende eller små trær, bla. gråskimmel (*Botrytis cinerea* Pers Fr.). Etter hvert som planter blir større, vil de bygge opp ett sterkere forsvar mot skadegjørere (Solberg & Dalen 2007). Likevel kan sopper infisere nytt plantevev også på eldre trær, slik som nye knopper og nåler som ikke ennå har utviklet vokslag. Unge skudd og nye nåler som ikke er lignifisert, det vil si utviklet et vokslag, er mest utsatt for infeksjon av sopp.

De fleste sopper liker relativt høy temperatur og høy luftfuktighet. Økt CO<sub>2</sub> innhold i luften er også med på å fremme soppenes vekstvilkår. Derfor vil en global klimaendring øke risikoen for soppsykdommer på skog- og bartrær (Solberg 2007). Tørkestress kan også gi trærne mindre motstandskraft mot sykdommer (Solberg & Dalen 2007).

Det finnes mange ulike sopper som angriper juletrær i produksjonsfelt. De mest vanlige i Norge på edelgran og gran er (alfabetisk ordnet etter vitenskapelige navn):

***Armillaria spp.*** (honningsopp) hører til hattsoppene som angriper røtter (nedbrytere). Symptomer er hvitt mycel som dannes under barken og i treverket, mørke rhizomorfer rundt røttene og rothalsen, og brune hattsopper ved stammebasis. Soppen er mest vanlig på grantrær her i landet, men er et økende problem på edelgran produsert til juletre i USA, Danmark og andre steder der man har dyrket flere generasjoner juletre.

***Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel** (anamorf: *Botrytis cinerea*) (gråskimmel) gir symptomer på nye skudd og nåler i form av mørke, fuktige flekker. Flekkene utvikler seg til nekrose. Soppen trives under fuktige forhold. Gråskimmel er ikke artsspesifikk. Den angriper lett plantevev som ikke er lignifisert (Talgø 2009).

***Chrysomyxa abietis* (Wallr.) Unger** (vanlig granrust) hører til rustsoppene. Angrep av granrust på årsskudd, kan føre til nålefall. Soppen kan forekomme på flere granarter og den har ikke vertskifte (Butin 1995).

***Delphinella abietis* (E.Rostrup) E. Müller** (edelgranskuddsopp) hører til bladfleksykdommene. Symptomer vises som gulning av nåler på årsskudd og senere blir nålene brune. Nålene ytterst på skuddene krøller seg og henger nedover. Mange små pseudothecier viser seg på de angrepne nålene. Skuddene kan også dø ved kraftige angrep. Soppen er funnet på mange edelgranarter som fjelledelgran, nordmannsedelgran, nobeledelgran og sibirsk edelgran i Norge (Solheim 1999)

***Herpotrichia parasitica* (R.Hartig) E.Rostrup** (edelgranfiltssopp) hører til nålefallsykdommene. Symptomer ses både på eldre og nyere nåler. Mycel dekker nålene slik at de blir gråaktige. Nålene henger nedover fra skuddet. Edelgranfiltssoppen kan forekomme på nordmannsedelgran, nobeledelgran, veitch edelgran og vanlig gran (Butin 1995).

***Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref** (rotkjuke) hører til kjukene som angriper treverk (nedbrytere). Symptomer viser seg som klorotiske nåler, rotråte og innvendig nedbryting av stammen. Rotkjuke er ikke artsspesifikk. Soppen er et problem i juletre dyrking i USA (Chastagner 1997) og kan også forventes å bli det her i landet.

***Lirula macrospora* (R.Hartig) Darter** (granbarstripesoppen) hører til bladfleksykdommene. Den angriper enkelte nåler. Nålene blir brunaktige og dør i løpet av første sesong. Soppen kan forekomme på flere granarter.

***Lophodermium piceae* (Fckl.) Höhn** (granskyttesopp) hører til nålefallsykdommene. Angriper eldre nåler som blir rød-brune og faller av, spesielt etter ekstremvær. Kan leve som en endofytt i flere år uten å forårsake skade (Butin 1995). Forekommer vanligvis på gran.

***Melampsora abieti-capraearum* Tub.** (edelgran-seljepilrust) hører til rustsoppene. Den vertsveksler mellom edelgran og selje (*Salix caprea*). Angrepne nåler blir klorotiske med små sporehus på undersiden. Funnet på nordmannsedelgran (Talgø 2009).

***Neonectria* spp.** hører til kreftsårsykdommene. Nye skudd dør, og innsunkne kreftsår kan sees på greiner og stamme (Talgø 2009). Kan angripe flere edelgranarter, men også gran (Butin 1995).

***Phaeocryptopus nudus* (Peck) Petr** hører til bladflekksykdommene. Angripet ses på fjorårsnåler som blir brune og blir hengende lenge igjen på treet. Forekommer på nobel- og fjelledelgran (Talgø 2009).

***Pucciniastrum epilobii* Otth.** (edelgranrustsopp) hører til rustsoppene. Den vertsveksler mellom edelgran og geitrams (*Epilobium angustifolium*) og andre mjølkearter (Solheim 2007). Angrep fører til brune nåler som krøller seg og faller av. Enkelte år ved stort smittepress kan toppskuddet bli angrepet og dø (Talgø 2009). Forekommer på nordmanns-, nobel- og fjelledelgran i Norge.

***Rhizosphaera kalkhoffi* Bubák** hører til nålefallsykdommene. Nålene blir nekrotiske og faller av. Skudd kan også dø i enkelte tilfeller. Forekommer på fjelledelgran, nordmannsedelgran og Korea edelgran, men kan også gå på andre bartrær, spesielt granarter (Butin 1995).

***S. polyspora*** har hovedfokus i denne oppgaven og får derfor bred omtale. Denne soppen er i systematikken klassifisert i rekken Ascomycota (no: sekksporesoppene), underrekken Pezizomycotina (no: ekte sekksporesopper), klassen Dothideomycetes (no: tykksekkopper), ordenen Dothideales, (no: tykksekkordenen) og familie Dothioraceae (Hibbett *et al.* 2007). *S. polyspora* er ikke artsspesifikk, men finnes på nåler og skudd på mange bartrearter (Smith 1988). Geografisk utbredelse av soppen er Europa, Russland og Nord-Amerika. Skadeomfanget av soppen er vanligvis lokalt og sporadisk og sies å følge insekt som furubargallmyggen (*Contarinia baeri*), og øke skadene etter den (Smith 1988).

*S. polyspora* fører til flekker på årsnålene, men ødelegger også årsskudd. *S. polyspora* produserer små, svarte kjønnsporehus (pseudothecier) som inneholder store, men få asci. Hver ascus inneholder 20-26 ca.  $6 \times 17 \mu\text{m}$  store, fargeløse ascosporer med septa (Smith 1988). Ascosporene spres med vind. I Norge har vi aldri observert det kjønnstadiet (teleomorfen), bare det ukjønnstadiet (anamorfe) konidiestadiet (Talgø *et al.* 2010a). I kultur består det anamorfe stadiet av konidioforer som dannes direkte på det vegetative mycelet (Sutton & Waterston 1970). Hyfene produserer store mengder sporer. Hyfene er korte og mørke med konidiedannelse i eller nær et septa (Deacon 2005). På plantemateriale dannes

pyknidier som inneholder konidiesporer. Konidiene er usepterte, eggformede og ca.  $4,4-12,5 \times 2,0-5,0$   $\mu\text{m}$  (Talgø 2009).

Kolonier på agar består av nedsenkede hyfer med lite luftig mycel (Figur 2). Mycelet er mørke brunt til svart, slik at fargen på soppen blir beskrevet som mørkpigmentert. Det anamorfe stadiet er veldig likt *Aureobasidium pullulans* (Smith 1988).



Figur 2. Frø av nobeledelgran (*Abies procera*) infisert med *Sydowia polyspora*, en uke etter inkubering. Foto: Eleonora Høst

Soppen blir i litteraturen ofte omtalt under to anamorfe (ukjønna) stadier; *Hormonema dematioides* (Lagerb & Melin) og *Sclerophoma pithyophila* (Corda) Höhn. I nyere tid har disse ukjønna stadiene blitt klassifiserte som synonyme (Anonym 2011a). Norske undersøkelser viste også at *H. dematioides* og *S. pithyophila* var identiske (Talgø *et al.* 2010a). Grunnen til navne forvirringen er at flekker på årspålene og døde årsskudd har blitt beskrevet som to forskjellige sykdommer, på engelsk kalt henholdsvis «Current Season Needle Necrosis» (CSNN) og «Sclerophoma shoot dieback» (Fig. 3).

CSNN er et av de største problemene i edelgranproduksjonen i USA og Europa (Chastagner & Benson 2000). CSNN symptomer kan sees i starten av juni ca. to til fire uker etter knoppskyting, ved at nålene får lysere (klorotiske) flekker/bånd. Flekkene/båndene kan ekspandere og senere i sesongen utvikle seg til rødbrune områder på nålene. Forekomsten av symptomer øker raskt fra juni til juli. De skadede områdene på nålene blir rødbrune utover sommeren. Nålene kan dø og falle av (Christensen 2008). CSNN ble tidligere forbundet med fysiologisk skade som følge av forskjellige abiotiske faktorer, temperatur, nedbør og/eller tilgang på næringsstoffer (Christensen 2008), men er nylig knyttet til *S. polyspora* (Talgø *et al.* 2010b). CSNN har blitt observert på nobeledelgran, fjelledelgran,



nordmannsedelgran og kjempeedelgran (*A. grandis*) i Europa. I de vestlige delene av Nord-Amerika, er det stor produksjon av nobeledelgran til juletre. Der er det i lavereliggende strøk observert svært mye CSNN på årsnålene i begynnelsen av juni, spesielt etter kjølig, fuktig vær etterfulgt av en periode med høy temperaturer og sterk innstråling (Chastagner & Benson 2000).

Symptomene var i USA lenge assosiert med mangel på kalsium fordi forsøk med tilførsel av kalsium førte til redusert symptomutvikling av CSNN under skuddstrekning, men man kunne ikke si om det hadde virket direkte eller indirekte (styrket nålenes cellevegg) på soppen (Chastagner & Benson 2000). Dette lot seg ikke gjenta i feltforsøk i Europa. Heller ikke i veksthusforsøk i Norge, der trærne vokste i vannkultur med liten tilgang på kalsium. Disse trærne utviklet ingen CSNN symptomer (Talgø *et al.* 2011).

I nyere undersøkelser ble det funnet *S. polyspora* på nåler med CSNN symptom fra USA, Østerrike, Danmark, Tyskland og Norge (Talgø *et al.* 2010b). Før disse undersøkelsene hadde CSNN blitt forbundet med soppen *Kabatina abietis* i Tyskland (Butin & Pehl 1993) og senere i Østerrike. Norske undersøkelser av referanse isolatet av *K. abietis* viste at det var identisk med *S. polyspora* (Talgø *et al.* 2010b), og *K. abietis* må derfor regnes som et synonym.

Danske og amerikanske forskere har kommet frem til at det er genetisk variasjon fra tre til tre med hensyn til utvikling av CSNN, noe som kan tyde på ulik resistens (Chastagner & Benson 2000).

Det har også blitt observert mindre forekomst av CSNN symptomer på årsskudd på skyggesiden av trærne enn på solsiden. I et forsøk i USA ble det vist at kunstig skygging av trærne med skyggenetting gav mindre symptomer av CSNN enn i kontroll leddet uten skygging (Chastagner & Benson 2000). Dette kan tyde på at sterk innstråling er med på å tørke ut de områdene på nålene som er angrepet av *S. polyspora*.

I Norge har nylig plantede trær vist CSNN symptomer allerede det første året etter planting. Symptomene er også funnet på planteskoleproduserte juletrær flere steder i verden (Talgø *et al.* 2010b). Det har ikke blitt observert symptomer det første leveåret, men eldre småplanter kan ha symptomer.

Når det gjelder «*Sclerophoma* shoot dieback» har denne sjukdommen i flere år gått under navnet *Sclerophoma*-skade i Norge. Siden dette er et innarbeidet begrep blant juletre dyrkere blir det vanskelig å endre det, selv om, på grunn av nyere klassifisering, *Sydowia*-skade ville vært et mer korrekt og mindre forvirrende navn. *S. polyspora* kommer inn i skuddene etter insektangrep eller andre biotiske eller abiotiske (vind, hagl o.a.) skader. Skuddene blir etter hvert nakne og dør. Ofte kan sporehus (pyknidier) sees på greinene. Skade forekommer både på gran og de vanligste edelgranartene som dyrkes som

juletrær. I Norge har smitteforsøk vist at unge nåler og ulignifiserte skudd er svake for *S. polyspora* (Talgø *et al.* 2011).

Under er det vist til et utvalg av publikasjoner som omtaler *S. polyspora*, ofte med de ukjønna slektsbenevnelsene *Sclerophoma* og *Hormonema*. Smith (1988) rapporterte at *S. polyspora*, en saprofytt som vanligvis lever på nåler av bartrær har vært assosiert med mange forskjellige symptomer; heksekost, skuddød, nålefall med flere. Skadeomfanget av soppen er vanligvis lokalt og sporadisk. Sutton & Waterson (1970) anså *S. polyspora* som et sårpatogen. Det samme gjorde Harrison (2009), de beskrev *S. polyspora* som en sekundær sopp som invaderer verten etter skade.

*Sclerophoma spp.* kan finnes som en endofytt i nåler av vanlig gran (Müller *et al.* 2001), men er en av de mindre kjente endofyttene. Den sporulerer på døde nåler på skogbunnen og spres med vindfylt rein fra skogbunnen og opp til kronene igjen (Müller *et al.* 2001). De undersøkte diversiteten av endofyttiske sopper på nålene til vanlig gran. *S. pythiophila* ble funnet på brune inkuberte nåler, men ikke på friske grønne nåler. *S. polyspora* ble funnet som en dominant endofytt på nåler av *Pinus ponderosa* fra Washington, USA (Sieber 2007). Pirttilä (2003) fant *H. dermatoides* i knoppkjellene på furu (*Pinus sylvestris*) i mars måned men ikke i juni. *H. dermatoides* blir assosiert med endofytt som lever på nåler på bartrær (Camacho *et al.* 1997). Enkelte epifyttiske *Hormonema*-arter produserer sopphekkende stoffer (Pelaez *et al.* 2000). *Hormonema* ble isolert både fra frø og nåler (nye og gamle) av *Pinus monticola* (Ganley & Newcombe 2006).

*S. polyspora* blir også beskrevet som en nedbrytersopp (saprotrof) (Deacon 2005), men soppen er ikke bare knyttet til plantepatologi. *S. polyspora* inneholder et viktig kommersielt polysakkarid kalt pullulan som blir brukt til å lage plastfolie i Japan (Deacon 2005). *S. polyspora*, sammen med sopper i slektene *Alternaria* og *Cladosporium* er nedbrytersopper som har utviklet en type tilpassning til vannstress. De lever vanligvis i phyllofæren til levende og døende blader. Disse soppene tåler lengre perioder med mye fuktighet eller tørke, men vokser ikke under forhold med lavt vannpotensiale (negativt). De soppene som lever på bladoverflatene er naturlig tilpasset fluktuerende fuktighet (Deacon 2005). Nye blader har vanligvis lav mycoflora, men etter hvert som bladene eldes blir overflaten dominert av slektene *Sydowia* og *Candida* (Deacon 2005). Videre blir *S. polyspora*, ofte under synonymet *Aureobasidion pullulans*, sammen med *Alternaria* og *Cladosporium* omtalt som svertesopper som angriper maling, beis og treverk. De lever på oppløselig cellulose i treverk eller løsninger i maling, tapetlim o.a., og lager et misfarget utseende på treverk og overflater som er behandlet med preparatene. Dette skjer fordi det ligner deres naturlige habitat, der de forekommer på blader og råtnede stengellev (Deacon 2005). *Sydowia* har ingen evne til å bryte ned naturlig cellulose. Soppen

vokser ofte der det er dårlig ventilasjon og er vanskelig å bli kvitt, når den først er etablert (Deacon 2005).

*S. polyspora* har også blitt funnet som en av flere sopper på veggene i den skadede reaktoren i Tsjernobyl (Zhdanova *et al.* 2000).



Figur 3. Symptomer på nordmannsedelgran (*Abies nordmanniana*) etter angrep av *Sydowia polyspora*; flekker på årnsålene (current season needle necrosis/CSNN) til venstre og døde skudd (Sclerophoma-skade) til høyre. Foto: Eleonora Høst

***Thekopsora areolata* (Fr.) P.Magn** (lokkrustsopp) hører til rustsoppene. Den angriper kongler og skudd på gran. Aecidier sitter på kongleskjellene. Soppen vertveksler mellom gran og hegg (*Prunus padus*) og andre *Prunus* arter.

Andre sopper som er funnet på gran og edelgran arter i juletefelt i Norge er: *Camarographium abietis* (Wils. & Anders) Grove, *Camarosporium* Schulzer, *Cladosporium* Link, *Cytospora* Ehrenb., *Diaporthe* Nitschke, *Fusarium* Link, *Gremmeniella abietina* (Lagerberg) Morelet, *Pestalotiopsis funerea* (Desm.), *Phomopsis* (anamorf til *Diaporthe*), *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisson, *P. megasperma* Drechsler og *Sirococcus* spp. (Talgø 2009).

## 2.4 Frøoverførte sopper

### 2.4.1 Generelt

Den beste måten å formere og oppformere juletrær på er såing av frø, men poding blir også brukt i spesielle tilfeller, for eksempel når man har arter og/eller kloner som har vist resistens mot *Phytophthora* spp. Forkunnskaper om frø av ulike slag er viktig. For eksempel må frø av edelgran kaldstratifiseres for å oppheve hvile, mens frø av gran eller furu ikke trenger stratifisering for å spire. Kaldstratifisering av frø kan by på problemer, for eksempel utvikler noen sopper seg ved fuktige forhold og lav temperatur og kan gi lavere spireprosent. Det kan være flere grunner til at frø ikke er spiredyktige eller er av dårlig kvalitet (lav spireprosent). Frøene kan bli skadet på forskjellig måter, både abiotiske og biotiske faktorer kan påvirke frøene. Av abiotiske faktorer er det spesielt modenhet (umodent eller overmodent) og alder (gammelt frø har ofte lavere spireprosent enn nytt) som påvirker spiring. Men også for høye temperaturer ved ekstrahering av frøet fra konglene eller for høy dose av middel til overflatebehandling av frøet, kan gi sterk reduksjon av frøspiring (Butin 1995). Gode lagringsforhold (tørt og kaldt) er også avgjørende for å bevare kvaliteten på frø. Av de biotiske faktorene som kan påvirke frøet er det soppsykdommer og insektskader som er dominerende.

Frø av edelgranarter blir importert. Denne importen kan føre med seg nye skadegjørere (Talgø 2009). Frø av trær har ofte mange typer patogener med seg, noe som kan resultere i flere problemer (Singh 1996).

En måte for å redusere smitten som følger med frøene er å beise dem. Beising er behandling med kjemiske midler eller andre stoffer. Det er en av de letteste måtene å kontrollere en skadegjører som er frøoverført. Ofte er det lettere å forebygge en soppsykdom, enn å behandle den senere. Har sykdommen først spredd seg i planteskolen eller produksjonsfeltet, kan tapene bli store. Økonomisk sett er det også viktig å finne en behandling som er lite kostbar, samtidig som den er effektiv. Der er også en stor fordel dersom beisemiddelet er ufarlig for mennesket og miljøet. Formålet med beisingen av frø er å fjerne/kontrollere sopp som sitter på frøoverflaten og sopp som finnes internt i frøet, men også påvirke sopp som ligger i jorda og kan angripe frøplantene under oppspiring. Det er viktig å velge beisemidler som er tilpasset til den soppgruppen som man vil beskytte imot. Beisemidler kan forårsake fytotoksisitet, det vil si at frøet dør eller bli spirehemmet. Behandlingsmetoden, dose og behandlingstid kan påvirke fytotoksisiteten.

Overflatesterilisering er en mye brukt metode for å fjerne sopper på frøoverflaten. Ved å overflatesterilisere frøene med klorkløsningsmiddel (1 %) eller hydrogenperoxid (30 %), vil man fjerne 90 % av alle overflatesopper (Littke 2011) som sitter utenpå frøet.

Kjemisk behandling av frø ved hjelp av fungicid, er en effektiv måte å kvitte seg med skadeorganismer på. Avhengig av hvilket preparat og hvilke aktive stoffer det inneholder, vil det enten holde seg på overflaten og beskytte frøkappen eller virke systemisk ved å bekjempe organismen inne i frøet. En kombinasjon av systemisk fungicid og overflatesterilisering kan være en effektiv måte å kontrollere begge infeksjonstyper i frø (Fraedrich 2009). Det finnes også naturlige fungicider, som er fremstilt av eteriske oljer av ulike slag, slik som mynte-, peppermynte-, oregano-, og timianolje, som inneholder bioaktive stoffer og har antimikrobielle egenskaper (Sokovic *et al.* 2009), som brukes mot spesielt frøoverførte soppsykdommer (Dal Bello & Sisterna 2010), en del slike preparater er også lov å bruke i økologisk landbruk da den økotoxiske faren forbundet med disse er liten.

Sopp som angriper frø kan deles inn i to grupper; spesifikke og ikke spesifikke sopper (Butin 1995). De ikke spesifikke er gjerne muggsopper og svertesopper, som er avhengige av høy luftfuktighet for å infisere. De går stort sett på den ytre delen av frøet (frøkappen). Men de kan også infisere den indre delen av frøet, hvis frøkappen er skadet på noen måte (Butin 1995). I gruppen ikke spesifikke sopper finnes for eksempel slektene *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium* og *Trichothecium*. Den andre gruppen består av spesifikke sopper som angriper frøet og forårsaker indre råte, som for eksempel *Rhizoctonia* og *Ciboria* (Butin 1995). Frøoverførte sopper kan føre til dårligere spireevne hos frøet, og stor dødelighet hos frøplanter i planteproduksjonen (Cram & Fraedrich 2011).

Det er flere måter å detektere frøoverførte sopper på. Man kan ved hjelp av radiografi finne ut om frøene er infisert innvendig eller ved å snitte og åpne dem, for å se etter mycel eller lignende. Frøoverførte sopper kan også finnes på frøene uten at det er noen ytre tegn eller symptom. Da må frøene legges på tilpasset vekstmedium for å se hva som vokser på dem (Cram & Fraedrich 2011). Frøets modenhet og hvor det blir plukket har også mye å si for hva slags organismer som finnes der. Noen sopper kan infisere når konglene kommer i kontakt med bakken, mens andre kan spres hurtig under fuktige forhold ute i felt eller på lager (Cram & Fraedrich 2011). Umodne kongler har en høyere andel sopper som vokser på dem enn mer modne kongler (Cram & Fraedrich 2011). Flere frøoverførte sopper finnes på planteavfall på skogbunnen, og kan infisere kongler som faller ned på bakken. Kongler som er samlet på bakken har en høyere andel frøoverførte sopper, enn kongler som er samlet i trærne. Det siste er spesielt tilfelle for soppen *Caloscypha fulgens* (Pers) Boud. Andre sopper, slik som *Sirococcus strobilinus* (DC), kan finnes på eldre kongler, og spres videre i kontakt med andre kongler eller frø (Sutherland *et al.* 1987).

#### 2.4.2 Hvordan patogen infiserer frø

Frøoverførte mikroorganismer kan deles inn i flere klasser (Nome *et al.* 2011):

1. De som har primært inokulum på frøet.
2. De der planterester som ligger igjen på frøet er viktigere som inokulum.
3. De som ikke er patogener på frø, selv om de finnes der.
4. De som reduserer kvaliteten på frøet ved å infisere det i felt eller på lager.

Det siste punktet gjelder for eksempel *Fusarium* og *Cladosporium* som infiserer i felt og *Penicillium* og *Aspergillus* som er såkalte lagringsopper. De to sistnevnte kan infisere alle typer frø ved dårlige lagringsforhold, dvs høy fuktighet.

Infeksjonsprosessen er avhengig av miljøforholdene som vertsplanten og patogenet lever under. Andre viktige faktorer som påvirker infeksjon er vertens og patogenets genotype, dvs vertens mottakelighet og patogenets aggresivitet. Vi skiller mellom to hovedformer for infeksjon; systemisk (indre infeksjon) og overflate eller ytre infeksjon (forurensing) (Nome *et al.* 2011). Den systemiske måten er en direkte måte å infisere på, der infeksjonen skjer gjennom ledningsvevet (xylemet) fra morplanten til embryoet (Kolotelo *et al.* 2001). Frøene kan også infiseres gjennom naturlige åpninger eller sår (Nome *et al.* 2011). Det samme patogenet kan bruke en eller begge av disse metodene til å infisere frøet. Eksempel på indirekte infeksjon av frø er når hyfer på konglene infiserer embryoet under pollinering. Dette skjer kun når soppsporeproduksjoner sammenfaller med bartreets pollineringstid. Frøoverført *Fusarium* infiserer på den sistnevnte måten. En annen indirekte måte er når soppen får kontakt med frøet, for eksempel kan frø smittes av den jordboende soppen *Caloscypha fulgens* når kongler blir høstet på bakken (Kolotelo *et al.* 2001).

#### 2.4.3 Frøoverførte sopper som kan være problematiske på juletrær

Flere frøoverførte sopper kan være problematiske både under oppformering av juletrær og i julerefelt.

***Botryotinia fuckeliana*** (gråskimmel) er en saprofytt og/eller svak parasitt. Sporer spres med vind og vannsprut. Gråskimmel finnes stort sett over alt i miljøet, så den er ikke bare overført med frø. Den er mest problematisk på småplanter som står tett i planteskolen og av og til i julerefelt under lengre perioder med fuktig vær, spesielt under bryting.

***Caloscypha fulgens*** (fagerbolle) har slektene *Abies*, *Pinus*, *Picea* og *Pseudotsuga* (douglasgran) som verter. Den spres via jord og dreper frø som kommer i kontakt med soppen. Soppen spres lett under kjølige forhold for eksempel fra infiserte til friske frø ved stratifisering.

***Fusarium spp.*** går stort sett på slektene *Abies*, *Larix* (lerk), og *Pinus*. Sporer spres med jord, vann, vind og frø. Som frøoverført vil den ødelegge frøspirer, nåler og skudd hos småplanter (Talgø 2009).

***Pestalotiopsis cocculi* (Guba) G.C. Zhao & N. Li** har vært funnet på frø av slektene *Abies*, *Chamaecyparis* (syppress) og *Thuja* (tuja) i norske forsøk. Den angriper skadde eller svake skudd, og blir regnet som en svak parasitt (Talgø 2009).

***Phomopsis sp.*** har vært funnet på *Larix*, *Picea* og *Thuja*. I 2005 ble det kjønnna stadiet *Diaporthe eres* funnet på *A. nordmanniana* (Talgø 2009). Sporene spres med vannsprut. Problemet er størst i planteskoler og nyplantinger, der det har blitt observert tilfeller av at noen få trær ringes og dør (Talgø 2009).

***Sirococcus conigenus*** har blant annet *Abies*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* og *Pseudotsuga* som verter. Den spres med vannsprut og vind, og overføres fra kongler der sporehusene sitter og over til frøene (Talgø *et al.* 2010a).

***Sydowia polyspora*** har allerede fått bred omtale, men her nevnes at i norske frøtester av edelgran ble *S. polyspora* funnet på frø av fjelledelgran, nordmannsedelgran og nobeledelgran (Talgø *et al.* 2010a), samt på frø av en rekke andre bartreslekter; lerk, gran, furu, douglasgran, tuja og hemlokk (*Tsuga sp.*) (Talgø *et al.* 2011). Funn av *S. polyspora* på furu stemmer godt overens med Whittle (1977) som rapporterte om opptil 98 % *S. polyspora* på furufrø (*P. sylvestris*).

#### 2.4.4 Sekundære sopper

Mange sekundære sopper er funnet i tidligere bartrefrøtester i Norge (Talgø *et al.* 2010a). Spesielt er *Penicillium spp.* vanlig.

***Penicillium spp.*** er en stor slekt innen muggsopper. Flesteparten av dem er saprophytter. Sporemassene er karakteristisk grønnaktige, vokser vanligvis hurtig og spres veldig lett. Sporer spres gjennom luft. På frø er den forbundet med dårlige sanke- og lagringsforhold (høy luftfuktighet). Kvaliteten på frø infisert med *Penicillium spp.* er ofte dårlig, da soppen kan påvirke spiredyktigheten (Malone & Muskett 1997).

## 2.5 Kochs postulater

Ofte blir det i plantepatologi brukt Kochs postulater for å bevise at organismer man isolerer fra plantemateriale er sykdomsfremkallende. Kochs postulater har fire kriterier som må oppfylles før man kan si at den organismen som er isolert er årsaken til symptomene. Kriteriene er (Agrios 2005) :

1. Den mistenkte mikroorganismen må være tilstede i verten som undersøkes.
2. Den mistenkte organismen må isolereres fra den infiserte verten, og dyrkes i kultur.
3. Når en ren kultur av organismen blir inokulert på en frisk vertplante, må verten reprodusere den spesifikke sykdommen.
4. Den samme mistenkte organismen må føre til de samme karakteristiske symptomer som i steg 2 og organismen må reisoleres

## 3. Materialer og metoder

### 3.1 Frø til beiseforsøk

Til beiseforsøkene ble det, basert på tidligere undersøkelser (Talgø *et al.* 2011), valgt ut to frøpartier fra bartrær som vi visste hadde mye *S. polyspora*. Vi fikk frøpartiene fra Skogfrøverket på Hamar; nobeledelgran (frøparti nr. F07-111) og alpefuru (*P. mugo* var. *rotundata*) (frøparti nr. F09-005). Frøene av nobeledelgran var sanket i en frøplantasje i Kaupanger i Sogn og Fjordane i 2007, og frøene av alpefuru i Danmark i 2008.

Ved Skogfrøverket på Hamar fikk vi demonstrert et røntgenapparat som brukes til å teste kvaliteten på frø. Det er koblet til en datamaskin med tilhørende software program. Røntgenapparatet (Faxitron X-ray, Mod.MX-20) tar bilde av frøene, og ved hjelp av programmet kan man analysere fyllingsgraden i frøet. Metoden brukes for å se om frøene er modne for innsamling/sanking. Frøene klassifiseres etter hvor godt fylt de er. Fyllingsgraden gis bokstav karakter; A som betyr godt fylt frø og B som betyr at frøet ikke er fylt helt. Kimen klassifiseres med tallene 2-4, hvor 2 betyr minst (kortest) kime og 4 betyr lengst kime. Alle frøene vi mottok var usorterte, dvs både A og B frø.

### 3.2 Frøbehandling (beising)

Det ble utført flere ulike frøbehandlinger. Vi brukte 400 frø per behandling. Beising av edelgranfrø ble gjort tirsdag 5. april 2011 og av furufrø 30. august 2011. Beisingene ble foretatt på laboratorium ved Bioforsk Plantehelse. Det ble brukt både kjemiske og biologiske preparater. I et tidligere forsøk ble det



vist at et preparat med blanding av de aktive stoffene boskalid og pyraklostrobin (Signum) hadde god effekt på mycelvekst av *S. polyspora* (Talgø *et al.* 2011). Preparatet ble derfor valgt som ett av beisemidlene i dette forsøket. Signum er et bredspektret, systemisk soppmiddel, som blant annet brukes forebyggende mot sopp sykdommer i frukt, bær og grønnsaker. Systemiske midler brukes for å eliminere sopper som sitter internt i frøet. Videre ble timianolje, eddiksyre og et *Streptomyces* preparat (Mycostop) valgt som beisemidler.

Timianolje inneholder stoffet thymol, og andre sopphekkende stoffer (Klaric *et al.* 2007) og har en antimikrobiell funksjon mot frøoverførte sopper og bakterier (Van der Wolf *et al.* 2008). Kritzinger (2002) fant ut at timianolje hemmet veksten av lagringsopper som *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* og *Fusarium equiseti* som ble isolert fra naturlig infiserte kikerter (*Vigna unguiculata*) i Sør-Afrika.

Eddiksyre ble valgt fordi det har vist god effekt mot frøoverførte sopp sykdommer i korn (Brodal & Henriksen, upublisert).

Som kommersielt tilgjengelig biologisk preparat ble Mycostop valgt. I Mycostop, et såkalt biofungicid, er det en type bakterie (*Streptomyces griseovirides*) som lever i jord og antas å beskytte plantenes røtter mot en del skadelige patogener. Det er anbefalt å bruke preparatet for å kontrollere patogener som kan følge med ulike frø. Det skal beskytte frøene når de plantes i jord ved å danne en beskyttende sfære rundt frøet i spireperioden (Agrios 2005).

Felles utstyr for alle behandlingene var sterilbenk, pinsetter, begerglass, målesylinder, sylindrisk metall sil til å legge frøene i for dypping i beisemidlene, 14 cm store petriskåler med filtrerpapir i bunnen og stoppeklokke. Sil, pinsett og annet utstyr som var i direkte berøring med frøene var sterilt (renset med sprit og/eller avbrent).

Frøbehandlingene var:

1. Ubehandlet kontroll

Her ble ingen behandling utført, frøene ble lagt direkte i petriskålen med filtrerpapir i bunnen.

2. Overflatebehandling med etanol og natriumhypokloritt

Løsninger: 70 % etanol, 0,5 % NaOCl.

Helte 100 ml av 70 % etanol og 100 ml 0,5 % NaOCl over i hvert sitt 100 ml begerglass. Frøene ble puttet i metallsil og dyppet i begerglasset med 70 % etanol i ti sekunder. Så ble de tatt opp og dyppet direkte ned i begerglasset med 0,5 % NaOCl i 90 sekunder. Frøene måtte dekkes godt av væskene. Etter

dyppingen helte vi frøene over i en stor petriskål med filtrerpapir i bunnen, hvor de ble fordelt godt utover i skåla slik at de kunne tørke godt over natta i en sterilbenk.

### 3. Eddiksyre behandling

Løsninger: Konsentrert eddiksyre (eng: acetic acid), destillert vann.

Målte opp 85 ml destillert vann med en målesylinder, og helte det over i ett 100 ml begerglass.

Pipeterte deretter 15 ml konsentrert eddiksyre ned i begerglasset med vann (15 % eddiksyre løsning).

Frøene ble dyppet på samme måte som i behandling 2, men kun i 30 sekunder. De ble så satt til tørk i sterilbenken til neste dag.

### 4. Behandling med soppmiddelet Signum (pyraklostrobin, boskalid)

Utstyr: hansker, spatel, pipette, plastskåler, glass med lokk, vekt, Signum (pulver ).

Behandling av nobeledelgran frøene: Målte opp den mengde Signum som var nødvendig til behandlingen (Vedlegg 1); 0,36 gram Signum per 100 gram frø. De 400 frøene ble veid i en plastskål. Totalt var det 17,79 gram frø. Dette krevde 0,064 gram Signum ( $17,79 \times 0,0036$ ). Brukte en spatel til å ta ut nøyaktig mengde pulver som ble veid opp i en plastskål. Etter oppveingen tok vi pulveret over i et glass med skrulokk og blandet Signum med 1 ml vann og ristet glasset godt til alt var oppløst. Helte så frøene oppi glasset med blandingen og ristet på ny for å få kjemikaliet godt fordelt på alle frøene. Frøene ble tørket over natta slik som de to foregående behandlingene.

Behandling av furufrøene: Også til furufrøene ble det brukt 0,36 gram Signum per 100 gram frø. Frøene veide 2,83 gram, så vi måtte bruke 0,01 gram Signum ( $2,83 \times 0,0036$ ). Pulveret ble blandet med 200  $\mu$ l destillert vann i et glass med skrulokk, tilsatt frøene og ristet. Frøene, som ble litt "klissete", ble tørket over natta som de andre behandlingene.

### 5. Behandling med Mycostop

Utstyr: vekt, glass med lokk, spatel, plastskål, kjøleskap og ferskt preparat av Mycostop (*Streptomyces griseovirides*).

Det ble brukt høyest anbefalte dose av Mycostop (Vedlegg 2), som er 8 gram per kilo frø.

Behandling av nobeledelgranfrø: Frøene ble veid opp i en plastskål. Frøene veide 17,18 gram. Dette krevde 0,14 gram Mycostop ( $0,008 \times 17,18$ ). Brukte spatel og plastskål til oppveing av Mycostop. Det oppmålte pulveret ble helt i et glass med lokk, der også frøene ble puttet oppi. Ristet så godt til pulveret var jevnt fordelt utover frøene. Glasset med frøene ble satt i kjøleskap ved 4-5 °C til dagen over.

Behandling av alpefuru frøene: Veide opp frøene og Mycostop, henholdsvis 2,79 gram og 0,022 gram. Mycostop ble veid opp og helt oppi et glass med lokk. Frøene ble tilsatt glasset med Mycostop, lokket ble satt på og glasset ristet godt til alt pulveret var fordelt (til det ikke satt noe pulver igjen på glasset). Frøene ble så helt over på petriskåler med filtrerpapir i bunnen, forseglet med parafilm og satt i kjøleskap ved 4-5 °C til dagen over.

#### 6. Behandling med timianolje

Utstyr: timianolje på flaske (*Thymus vulgaris*), Tween 80, destillert vann, pipette med tilhørende spisser, målebeger, kolbe med magnet og magnetblander, termometer.

Nobeledelgran frøene ble behandlet med en konsentrasjon på 5 % timianolje. Det vil si 5 ml timianolje ble blandet med 95 ml destillert vann, altså 100 ml løsning med 5 % timianolje. Pipetterte opp 10 µl Tween 80 og tilsatte det i oljeblandingen for at oljen lettere skulle blandes med vann.

Furufrøene ble behandlet med 2,5 % timianolje (2,5 ml timianolje pluss 97,5 ml destillert vann og 10 µl Tween 80).

La en magnet i bunnen av glassene og skrudde lokket på. Satte glassene på en magnetblander med varme. Magneten roterte samtidig som vannet ble varmet opp til 40 °C i 5 minutter slik at oljen løste seg. Helte så væsken over i 100 ml begerglass og dyppet metallsilen med frøene i oljeløsningen, der de lå i 5 minutter. Frøene ble satt til tørk i sterilbenken til dagen etter.

Også 1 % konsentrasjon ble brukt til en test av furufrøene.

### 3.3 Analyse for frøoverførte sopper

utstyr: pinsett, 9 cm petriskåler med PDA agar (Vedlegg 3), lampe og sprit til avbrenning,

Analysen ble utført ved Kimen Såvare laboratoriet AS i Ås. For edelgran ble 200 frø lagt ut i skåler med PDA agar dagen etter at de hadde blitt beiset. Halvparten av disse ble satt til driving (inkubering) samme dag (6. april 2011), mens resten stod natta over i kjøleskap før inkubering. For furufrøene ble 100 frø lagt ut og inkubert 31. august og et gjentak på nye 100 frø dagen deretter.

Det ble brukt 40 skåler per behandling (6 behandlinger) med fem frø i hver skål. Frøene ble lagt på PDA agaren med steril (avbrent) pinsett. For å stimulere sporeproduksjon ble skålene plassert i et spesialrom med NUV-lys (Near Ultra Violet Light) som var plassert ca. 45 cm over bordene. Det vekslet mellom 12 timer NUV-lys og 12 timer mørke. Rommet holdt en konstant temperatur på 21 °C. Registrering av

soppvekst ble utført en uke etter utlegging. Hvert frø ble undersøkt ved hjelp av stereomikroskop (6 - 50× forstørrelse). Resultater ble notert som antall frø med vekst av de ulike soppene. Identifisering ble i hovedsak basert på morfologiske kjennetegn, inkludert sporer, pyknidier og delvis mycelvekst. Prosent frø infisert med de ulike soppene ble beregnet.

### 3.4 Spiretesting av frøene

Utstyr: Papirveker til spirebordet, 130mm Munktell filtere (runde spirelapper), rene glassklokker til å sette over spirelappene.

De resterende 200 frøene fra hver frøbehandling og planteart ble spiretestet ved Skogfrøverket på Hamar. Skogfrøverket var ansvarlig for spiretestingen, men i forbindelse med denne oppgaven ble det deltatt i prosessen. Testen gikk ut på å finne ut om frøene var spiredyktige etter de ulike behandlingene. Før spiretesten ble frøene fra nobeledelgran kaldstratifisert, det vil si lagret mørkt og fuktig under kjølige forhold (4-5 °C) i tre uker.

Spiretesten ble utført på spesielle spirebord med termostat hvor temperatur og tid kunne stilles inn og styres. Spirebordene bestod av renner med et vannbasseng under. Vannet ble trukket opp til bordets overflate ved hjelp av papirveker. Vekene ble dyttet mellom rennene til de traff vannet under.

Termostaten og lys i rommet var stilt inn på 28 °C med 8 timers dag og 20 °C med 16 timers natt (en vanlig innstilling for de fleste frøarter (Heidi Rødsok Bye, Skogfrøverket, pers. samtale)). Filtrepapirene med frøene fra de forskjellige behandlingene ble løftet fra petriskålene de lå i og over på spirelapper som lå oppå vekene på spirebordet. På den måten forstyrret vi ikke eventuell begynnende soppspiring på frøene. Filtrepapirene ble trykt godt ned slik at de hadde god kontakt med de fuktige spirelappene. Hver behandling ble lagt ved siden av hverandre bortover bordet. Tilslutt ble det satt en glassklokke over alle papirsirkene på spirebordet (Fig. 4). Klokkene vil hjelpe til å holde på fuktigheten.

Filtrepapirene var merket med nummer og gjentaknummer.

De frøene som spirte normalt, dvs rota kom først ut av frøskallet, ble fjernet etter 7, 14, 21 og 28 dager for edelgranfrøene, og 7, 10, 14 og 21 dager for furufrøene. Spirende frø der frøblad kommer ut først defineres som abnorme spirer. Dette gjør det vanskelig for frøplanten å etablere seg i ettertid, da rotsystemet henger igjen i frøskallet. En annen abnormalitet er fysisk ødeleggelse av det apikale vevet i rotsystemet, dobbelt embryo (vanlig blant bartær) og infeksjon av patogener (Kolotelo 1997). Etter siste registreringsdag ble de frøene som ikke hadde spirt snittet langsgående og delt inn i ulike kategorier avhengig av om de var tomme, døde matede eller friske uspirte. Når det er mer enn 5 % uspirte frø i et ledd blir det tatt en tetrazoliumtest (Nitro-Blue Tetrazolium Test) av frøene for å sjekke om frøene er

døde eller friske uspirte. Abnorme spirer utgjør vanligvis en lav prosentandel i et frøparti, og blir ikke tatt med i spireprosenten som regnes ut tilslutt. Testen går ut på å legge de snittede frøene som skal kontrolleres i en tetrazoliumløsning (tetrazolium salt), hvor fargen fra tetrazoliumen blir tatt opp av levende vev. Levende frø blir da farget, mens døde forblir ufarget. Man kan da lett bedømme om frøene er døde eller levende. Det er en såkalt hurtigtest, som brukes for å avgjøre frøspiredyktighet raskt. Testen ble utført på begge typer frø.



Figur 4. Spirebord med klokker over spirelappene hvor frøene ligger til spiring. Foto. Eleonora Høst

### 3.5 Statistikk

Det ble utført statistiske beregninger for frø smittet med *S. polyspora* og *Penicillium* spp. og spireprosenten i de ulike behandlingene. Beregninger ble gjort i programmet Minitab 16 Statistical software. Behandlingene ble testet for forskjeller i gjennomsnitt ved F-test (ANOVA), og eventuelle signifikante forskjeller ble separert ved hjelp av Bonferroni metoden med signifikansnivå 5 % (standard).

### 3.6 Smitting av trær for å fullføre Kochs postulater

Utstyr: Toårig fjelledelgran, toårig nordmannsedelgran, *S. polyspora* isolat (8/11-F07-111-12)(Figur 5), 10 pluggbrett med plass til 15 planter, jord blandet med sand (3:1 forhold), saks, vanningsmatte, desinfiseringsmiddel, 10 plantebrett, vekstroom med kontrollert klima, destillert vann, ren pensel (liten

kunstpensel), autoklaverte kartnåler med hvitt hode, 70 % etanol, pinsett, engangshansker, store klare plastposer til å tre over trærne etter smitting, lange plantepinner for støtte og markeringsklyper.



Fig.5 Isolatet av *Sydowia polyspora* som ble brukt i smitteforsøket. Foto: Eleonora Høst

Det ble utført smitteforsøk med et isolat av *S. polyspora* som vi fant på nobeledelgranfrøene (kontrolløddet uten overflatebehandling)(Figur 5.). Det ble laget sporesuspensjon ved å helle 1 ml destillert vann i hver agarskål med 4-7 dager gammelt isolat av *S. polyspora*. To ulike bartrearter ble brukt; fjelledelgran og nordmannsedelgran. Plantene kom fra Reiersøl Planteskole i Froland som toårige pluggplanter. Pluggbrettene og plantebrettene var vasket grundig og desinfisert med 70 % sprit. Det ble brukt tre pluggbrett til hver plantetype (45 planter). I tillegg ble det brukt ett pluggbrett til kontroll (usmittede planter) med en rad (5 planter) fjelledelgran og en rad nordmannsedelgran (5 planter).

Etter at de var plantet i pluggbrettene ble de merket med plantetype og dato, satt i vanningsbrett med filtermatte, vannet godt og satt i et vekstområde til driving. Vekstområdet var innstilt på en konstant temperatur på 16 °C, 85 % luftfuktighet, 16 timer dag og 8 timer natt. Lysstyrken ble målt i PAR, over toppsjiktet av plantene (ca 30 cm fra hylleplaten) og ca. 25 cm under lysstoffrørene. Fjelledelgranen hadde en gjennomsnittlig lysstyrke på  $132 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (n=4). Mens nordmannsedelgranen som stod i hyllen under hadde en gjennomsnittlig lysstyrke på  $135 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (n=4).

Da de første plantene hadde begynt å bryte/mistet knoppkjellet (hetten), startet smittingen (Fig.6). Det er da de er mest vare for soppangrep, altså før vokslaget begynner å bygge seg opp. Edelgran bryter svært ujevnt både mellom planter av samme art og innen samme plante. Knoppene var derfor på svært ulike utviklingsstadier da smittingen begynte.



Fig. 6 Knopper av nordmannsedelgran (*Abies nordmanniana*) i rett stadium for smitting. Foto: Eleonora Høst

Det ble brukt tre ulike smittemetoder; 1 pensling av unge skudd med sporesuspensjon, 2 kart nåler som var duppet i soppkulturen og stukket inn i skuddene like under knoppene og 3 påføring av sporesuspensjon etter napping av nåler. Ett brett av hver plantetype ble behandlet med hver metode og fem skudd ble behandlet per plante. Smittingen skjedde i vekstrommet der plantene hadde stått til driving. To uker etter omplantingen (14. juni 2011) hadde kun fjelledelgranen begynt å bryte. Skuddene hadde akkurat mistet "hetten". På fjelledelgranen ble det utført pensling denne dagen, mens nålesetting og såring ble utført den 17. juni. Detaljert beskrivelse av de ulike smittemetodene følger i punktene under:

1. Pensling av smitte (sporesuspensjon) direkte på skuddene. Fem skudd per plante skulle smittes. Brukte en ren pensel (desinfisert med 70 % etanol). Tilsatte 1 ml destillert vann i agarskålen med soppen, og blandet/rørte skikkelig med penselen til soppsporene var blandet i vannet. Valgte fem skudd per plante som var i det rette utviklingsstadiet og hengte på hvite markeringsstrips. Deretter ble knoppene penslet med soppsmitte (Fig. 7), slik at det dekket godt. Dette ble utført 14. juni 2011.
2. Nåler med smitte ble satt rett under knoppene (Fig. 7). Knopper i rett stadium (begynt å svulle) ble valgt ut. Stakk først ett hull med kartnålen noen millimeter fra knoppen. Deretter ble nålen brukt til å skrape litt soppmycel og sporer opp fra skålen og så ble nålen plassert tilbake i det lille hullet som allerede var laget. Smittingen ble utført 17. juni 2011.

3. Valgte ut skudd i riktig stadium (3-5 cm) (Fig. 6), og brukte pinsett eller fingre til å nappe ut noen få nåler på de utvalgte skuddene. Deretter ble nålefestene straks penslet med smitte, på samme måte som i smittemetode 1. Smittingen ble utført 17. juni 2011.



Fig. 7. Smittning av fjelledelgran (*Abies lasiocarpa*) med smittemetodene pensling av sporesuspensjon på nye skudd (venstre) og bruk av infiserte kartnåler (høyre). Foto: Eleonora Høst

Nordmannsedelgranen brøt veldig ujevnt, og ikke alle plantene på brettene ble smittet, da noen ikke hadde begynt å bryte ved smittetidspunkt. De som ble smittet ble smittet med de samme metodene som fjelledelgranene. Kontrollplantene ble også smittet med de samme tre metodene, fem planter av hver art.

Når ett Brett var ferdig behandlet ble det trukket en plastpose over brettet (Fig. 8). Posen ble støttet opp ved hjelp av to plantepinner som ble plassert i hver sin ende av brettet. Plastdekket ble brukt fordi det er viktig at soppsmitta ikke tørker ut. Plastposen ble fjernet etter seks dager fra smittedato.





Fig. 8. Smittede nordmannsedelgranplanter (*Abies nordmanniana*) med plast trukket over. Foto: Eleonora Høst

For at Koch's postulater skulle bli oppfylt måtte det reisoleres (på PDA) fra smittede plantedeler med symptomer, for å se om det var *S. polyspora* som var årsaken til skaden.

Fjelledelgran plantene som fikk satt inn kartnåler på smittetidspunktet, var de som tidligst viste tegn til symptomer og som vi startet med å reisolere fra. Plantene på dette brettet ble nummeret fra 1-15. Områdene rundt kartnålene ble klippet ut og lagt i en plastpose merket med plantens nummer. Dette ble gjort for alle 15 plantene på brettet. Fjelledelgran plantene hvor det ble nappet nåler eller skuddene ble penslet, viste lite symptomer, men også disse ble nummerert og prøver ble tatt ut. Alle posene ble tatt med til laboratoriet for isolering hvor de fikk følgende behandling:

Prøvene som var infisert med kartnåler (smittemetode 2) ble undersøkt for kreftsår /mørke områder i vevet der nålene hadde stått. Området rundt kartnålene ble delt i mindre biter og overflatesterilisert i en tesil i 10 sek. i 70 % etanol og 90 sek. i 0,5 % NaOCl. La så plantebitene til tørk på filterpapir i noen minutter. Da bitene hadde tørket i overflaten, ble de kuttet/delt i mindre biter ved hjelp av skalpell. Bitene ble delt slik at det var litt friskt vev sammen med det infiserte. Fem biter ble lagt på en agarskål og inkubert ved romtemperatur. Reisoleringene ble foretatt 5. september 2011.

Der nålene var nappet vekk på skuddene (smittemetode 3) kunne man se at det var litt brunt der nålene hadde siddet, men skuddene så relativt friske ut. Disse skuddene ble kuttet i ca 1 cm lange deler og overflatesterilisert som over. Etter noen min. til tørk i sterilbenken ble stenglene delt i to langsgående biter ved hjelp av skalpell. Den siden som hadde blitt smittet (såret) ble lagt ned, altså i direkte kontakt med agaren. Det ble lagt ut fem biter i hver skål, som så ble lukket med parafilm og inkubert i romtemperatur. Reisoleringen skjedde 12. september.

Der sporesuspensjon av *S. polyspora* var penslet på nye skudd uten først å såre (smittemetode 1), ble døde eller skadede nåler nappet av og overflatesterilisert slik som de andre prøvekategoriene over. Fem nåler ble lagt ut i hver skål og inkubert i romtemperatur. Reisoleringen fant sted 13. september.

Det samme som for fjelledelgran ble gjort med de forskjellige behandlede plantene av nordmannsedelgran. Isoleringen fra disse ble utført 14. september.

Vi tok også nåler fra alle kontrollplantene til isolering; 15 nåler fra hver treart. Fem nåler ble lagt ut i hver skål etter overflatesterilisering.

### **3.7 DNA analyse til identifisering av sopper**

Det finnes flere molekylære metoder som brukes i plantepatologi (Agrios 2005). PCR (polymerase chain reaction) er en metode som er mye brukt i plantepatologien. Det er en spesifisitetstest, hvor du kan detektere den organismen du er ute etter. Ofte er det vanskelig å skille ulike organismer basert på morfologi, eller ulike organismer viser samme symptomer. Da kan molekylære metoder være raskere og enklere. Som regel blir DNA ekstrahert fra isolatene og sekvensert. DNA prøvene fra dette forsøket ble sendt til utlandet for sekvensering. Deretter kunne identifisering skje ved hjelp av en database i GenBank.

Det ble utført ITS (internal transcribed regions) sekvensering av ribosomalt DNA (rDNA) av 13 isolater funnet på furufrø. Disse kunne ikke identifiseres ved hjelp av lupe eller mikroskop (morfologisk), da det ikke var sporeproduksjon i kulturene. ITS er ufunksjonelle områder mellom de ribosomale genene og finnes i alle organismer. De brukes ofte for identifisering av sopper. Ved bruk av ITS områdene kan man skille mellom arter (Martin & Rygiwicz 2005). ITS områdene er unike og godt konserverte. Det er stor variasjon an ITS områdene mellom artene, slik at disse kan brukes for å identifisere til art. Man må bruke ITS primere for å identifisere sekvensene. I forsøket ble primerne ITS 1 og ITS 4 brukt for å amplifisere det tilhørende ITS området.

DNA ekstrahering blir utført 19. oktober 2011 fra alle de 13 skålene. Mycel ble skrapt av med en spatel og overført til en morter. Flytende nitrogen ble helt i morteren slik at det organiske materialet frøs før det ble knust til fint pulver. Pulver fra hvert isolat ble puttet i hvert sitt eppendorf-rør. Ved å følge de forskjellige stegene i protokollen til DNeasy Plant Mini Kit (Vedlegg 4), ble DNAet ekstrahert. Etter at alle stegene var fulgt, ble det laget ett sett med 10 × fortytning av de samme prøvene i egne eppendorf-rør (utført 20. oktober 2011). Så ble det laget en Master-mix (som kalkuleres og lages opp til alle prøvene). De ufortynnede og de fortyttnede prøvene ble pipettert sammen med Master-mix etter

hverandre i spesielle remser med små rør. Rørene ble deretter satt i en PCR (polymerase chain reaction) maskin for å lage mange kopier av (amplifisere) DNA sekvensene. I mellom tiden ble det laget en 1 % agarose gel som skulle brukes når PCR produktene var ferdig i maskinen. Agarose gelen ble satt på et voltmeter da den hadde stivnet. Fra hver av PCR prøvene ble 2 µl DNA, 1 µl blåfarge (loading buffer) og 3 µl destillert vann pipettert over i ett spesielt brett med fordypninger, en prøve i hver fordypning. Deretter ble hver prøve overført ved hjelp av en pipette til små brønner i gelen. Voltmeteret ble stilt inn på 110 V i 50 min. Deretter ble gelen lagt inn i en Gel-Doc maskin (BIO-RAD) som ved hjelp av UV-lys tar bilde av gelen, og man kunne se de ulike båndene (DNAet) som har forflyttet seg nedover gelen. Loading bufferen gjør at man kan se båndene på gelen. Brukte 100 basepar ladder for å finne DNA fragmentene. Mengden DNA avgjør om man ser bånd på gelen, jo mer DNA jo sterkere bånd. Gelen i dette forsøket viste at alle utenom to isolater hadde klare og tydelige bånd, dvs at DNA fantes der, slik at sekvenseringen kunne utføres.

## 4 Resultater

### 4.1 Registrering av soppvekst og spireprosent etter de ulike frøbehandlingene

På nobeledelgranfrøene ble det totalt funnet sopper fra 11 slekter pluss en uidentifisert (Tabell 1). En stor andel av frøene i behandlingene ubehandlet og Mycostop, var infisert med *S. polyspora*. Behandlingen som hadde best virkning mot *S. polyspora* var soppmidealet Signum og timianolje, hvor soppen ikke vokste i det hele tatt. Behandlingen med eddiksyre gav også ganske bra resultat, med få *S. polyspora* infiserte frø. I behandlingen med timianoljen var det heller ingen vekst av andre sopper. For Signum derimot var mange frø infisert med gråskimmel. Alle behandlingene utenom kontrollen og Mycostop reduserte mengden av *Penicillium* spp.

Resultatene fra de statistiske beregningene fremgår i Tabell 2. Det ble gjort statistiske beregninger på forekomsten av de to soppsektene det var mest av i testen (*Sydowia* og *Penicillium*). For oversiktens skyld er derfor resultatene for disse to slektene representerte i både Tabell 1 og 2. For både *S. polyspora* og *Penicillium* spp. var kontrollen og Mycostop signifikant forskjellige fra de andre behandlingene på 5 % nivå. Best spireprosent ga den ubehandlede kontrollen (51 %), Signum (45,5 %), eddiksyre og Mycostop som ikke lot seg skille. Når det gjelder prosent døde og matede frø var det heller ingen forskjell på kontroll, Signum, eddiksyre og Mycostop på 5 % nivå. Ingen av frøene behandlet med timianolje spirte, de fikk klassifisering c (mest ulik kontrollen).

Dersom tomfrøene blir trukket fra blir spireprosenten for behandlingene timianolje, overflatesterilisering, eddiksyre, Signum, Mycostop og kontroll henholdsvis (tilnærmet); 0, 42, 68, 82, 76 og 80 %.

Tetrazoliumtesten viste at alle frøene i leddet timianolje var døde.

Tabell 1. Prosent frø av nobeledelgran (*Abies procera*) som var infisert med ulike sopper etter beising (6 behandlinger, gjennomsnitt av to gjentak).

Sopp:	Ubehandlet (kont.)	Overflatesterilisert	Timianolje	Signum	Eddiksyre	Mycostop
<i>Alternaria</i> sp.	1	2,5	0	0,5	0,5	0
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	0	0,5	0
<i>Botrytis cinerea</i>	11	22	0	41,5	1,5	26
<i>Dictyopolschema</i> sp.	7	0	0	0	0	1
<i>Epicoccum</i> sp.	0	0	0	0	0	2
<i>Fusarium</i> sp.	0	0	0	0,5	0,5	0
<i>Mucor</i> sp.	1	0	0	0,5	0,5	1
<i>Penicillium</i> spp.	95	31	0	4,5	18,5	95
<i>Rhizopus</i> sp.	0	0	0	0,5	0	1,5
<i>Sydowia polyspora</i>	76	50	0	0,5	19	80
<i>Trichothecium</i> sp.	0	0,5	0	0	0	0
Ukjent	2	12,5	0	2,5	10	0,5

Tabell 2. Forekomst av soppsektene *Sydowia* og *Penicillium* samt spireprosent av frø fra nobeledelgran (*Abies procera*) 28 dager etter de ulike behandlingene, inkludert resultater fra statistiske beregninger. Tallene representerer gjennomsnitt fra 4 gjentak a 50 frø og er oppgitt i %. Abnorme spirer er summen av fysisk skadde spirer og spirer skadet av primær og sekundær smitte.

Behandling:	% <i>Sydowia</i>	% <i>Penicillium</i>	% normale spirer	% abnorme spirer	% friske uspirte	% tomfrø	% døde matede
Kontroll	76a	95a	51a	1,5	0	36	11,5c
Overflatesterilisering	50b	31b	23b	1,5	0	45,5	30b
Eddiksyre	19c	18,5bc	39,5a	10,5	0	42	8c
Signum	0,5d	4,5cd	45,5a	2,5	0	44,5	7,5c
Mycostop	80a	95a	37ab	3	0	51	9c
Timianolje 5 %	0d	0d	0c	0	0	48,5	51,5a

Gjennomsnitt med ulike bokstaver (a-d) i samme kolonne er signifikant forskjellige.

På furufrøene ble det totalt funnet sopper fra 23 slekter pluss en uidentifisert (Tabell 3). Også blant furufrøene var det en stor andel *S. polyspora* infiserte frø i kontrollen og ved behandling med Mycostop. Ved overflatesterilisering var det også relativt høy prosentandel *S. polyspora*. Ingen frø infisert med *S. polyspora* ble registrert i behandlingene eddiksyre, Signum og timianolje 2,5 %. I behandlingen timianolje 1 % ble ett frø (0,5 %) med *S. polyspora* funnet. Mycostop så ut til å redusere mengden *Penicillium* litt, men det var ingen signifikant reduksjon på 5 % nivå (Tabell 4). Timianolje eliminerte *Penicillium* spp., mens både eddiksyre og Signum reduserte *Penicillium* forekomsten til en halv prosent.

For normale spirer var begge timianoljebehandlingene signifikant forskjellige fra alle de andre leddene, de var også forskjellige fra hverandre. Det samme gjaldt for de friske uspirte. For døde matede var timianolje 2,5 % signifikant forskjellig fra kontrollen (Tabell 4).

Det var en mye høyere prosentandel normale spirer i dette frøpartiet enn i partiet med edelgranfrø. For furufrøene var det bare behandling med timianoljen som førte til lave spireprosent, men likevel var disse på høyde med flere av behandlingene av edelgranfrøene. I dette frøpartiet var det også en høy andel av friske uspirte frø i begge leddene av timianolje. Tetrazoliumtesten viste at alle de frøene som ble bedømt som levende under snitting, også ble bedømt som levende etter tetrazoliumtesten (Heidi Rødsok Bye, Skogfrøverket, pers. samtale). Det var også en mye lavere prosent abnorme spirer i denne testen sammenlignet med edelgranfrøene. Det kan være fordi det var svært lite smitte av sopper under testen, både primære og sekundære. Det var kun en abnorm spire under leddet Timianolje 2,5 %.

Tabell 3. Prosent frø av alpefuru (*P. mugo* var. *rotundata*) som var angrepet av sopper i de ulike behandlingene (gjennomsnitt av to gjentak a 100 frø, \*= sekvensert isolat).

Sopp:	Ubehandlet	Overflate-					Timianolje	Timianolje
	(kont.)	sterilisert	Eddiksyre	Signum	Mycostop	1 %	2,5 %	
<i>Alternaria</i> sp.	0	0	0	0	1,5	0	0	
<i>Anthostomella pinea</i> *	0	0,5	0	0	0	0	0	
<i>Aspergillus niger</i>	1	0	0	0	0,5	0	0	
<i>Aureobasidium</i> sp.	0	1	0	0	0	0	0	
<i>Botrytis cinerea</i>	0,5	0	0	0	0	0,5	0	
<i>Camarosporium brabeji</i> *	0,5	0,5	0	0	0,5	0	0	
<i>Cladosporium</i> sp.	0	0,5	0	0	0,5	0	0	
<i>Dictyopolyschema</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Epicoccum</i> sp.	0	0	0,5	0	0	0	0	
<i>Fusarium</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Heterobasidion</i> sp.*	0	0	0,5	0	0	0	0	
<i>Lewia infectoria</i> *	0,5	0	0	0	0,5	0	0	
<i>Mucor</i> sp.	0	0,5	0	0	0	0	0	
<i>Penicillium</i> spp.	41,5	3	0,5	0,5	30,5	0	0	
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0	0	0	0	0,5	0	0	
<i>Pezicula eucrita</i> *	0,5	0	0	0	0	0	0	
<i>Phoma</i> spp.(ett isol.*)	5	0,5	0	0	3,5	0	0	
<i>Ramichloridium pini</i> *	0	1	0	0	0	0	0	
<i>Rhizopus</i> sp.	0,5	0	0	0	0	0	0	
<i>Sydowia polyspora</i>	58	13	0	0	62,5	1	0	
<i>Trichoderma</i> sp.	1,5	0	0	0	0,5	0	0	
<i>Trichothecium</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Trametes ochracea</i> *	0	0	1	0	0	0	0	
Ukjent	1,5	2	0	0	5	0,5	0	

Tabell 4. Forekomst av soppselektene *Sydowia* og *Penicillium* samt spireprosent av frø fra alpefuru (*P. mugo* var. *rotundata*) 21 dager etter de ulike behandlingene, inkludert resultater fra statistiske beregninger. Tallene representerer gjennomsnitt fra 4 gjentak a 50 frø og er oppgitt i %. Abnorme spirer er summen av fysisk skadde spirer og spirer skadet av primær og sekundær smitte.

Behandling:	% <i>Sydowia</i>	% <i>Penicillium</i>	% normale spirer	% abnorme spirer	% friske uspirte	% tomfrø	% døde matede
Kontroll	58a	41,5a	97,5a	1	0c	0	1,5b
Overflatesterilisering	13b	3c	96a	1,5	0c	0	2,5ab
Eddiksyre	0c	0,5c	95,5a	0,5	0c	0	4ab
Signum	0c	0,5c	95a	0	1,5c	0	3,5ab
Mycostop	62,5a	30,5b	95,5a	1	1c	0	2,5ab
Timianolje 1 %	1c	0c	67b	0,5	29b	0	3,5ab
Timianolje 2,5 %	0c	0c	40c	2	48,5a	0	9,5a

Gjennomsnitt med ulike bokstaver (a-d) i samme kolonne er signifikant forskjellige.

De sekvenserte isolatene som hadde klare treff i GenBank er inkludert i tabell 3. Treffprosenten er oppgitt i parentes i beskrivelsen under:

***Anthostomella pinea*** (99.3%) ble funnet på et overflatesterilisert frø. Sporehus til denne sekksporesoppen er rapportert på brune nåler av furu (Crous & Groenewald 2010).

***Camarosporium brabeji*** (100 %) ble som det fremgår av tabell 3 funnet etter tre ulike behandlinger. *C. brabeji* er funnet som en endofytt på furu (Botella & Diez 2011).

***Heterobasidium annosum*** (100%) I databasen var det sekvenslikhet med 3 forskjellige *Heterobasidium* spp. (*H. annosum*, *H. parviporum*, *H. abietinum*), noe som gjør det vanskelig å konkludere på art uten videre undersøkelser.

***Lewia infectoria*** (100 %) ble funnet på ett ubehandlet frø og ett som var behandlet med Mycostop. *L. infectoria* er det kjønna stadiet til *Alternaria infectoria*, en sopp som blant annet er funnet på hvetepanter i Argentina (Perello & Sisterna 2008).

***Pezicula eucrita*** (100 %) ble bare funnet på ett ubehandlet frø. En annen art i denne slekten, nemlig *P. livida*, er kjent for å føre til nekrose og ringing av barken på unge planter av lerk og furu (Butin 1995).

***Phoma exigua* var. *exigua*** (99,8 %) isolatet var fra ett ubehandlet frø. Denne soppen er vidt utbredd i alle verdensdeler og blir beskrevet som en svakt parasittær jordboende sopp (Boerema *et al.* 2004).

***Ramichloridium pini*** (99,3 %) ble funnet på ett overflatesterilisert frø. Denne arten er forbundet med skuddød på furu, spesielt kontortafuru (*P. contorta*) i Storbritannia (Brown & Macaskill 2005).

*Trametes ochracea* (100 %) ble funnet på ett frø som var behandlet med eddiksyre. Denne soppen blir på norsk kalt beltekjuka og blir beskrevet som en vanlig lagringsråtesopp på tømmer av løvtrær (Roll-Hansen & Roll-Hansen 1993).

#### 4.2 Smitteforsøk

Den eneste behandlingen som ga tydelige symptomer var der kartnåler med smitte var brukt på fjelledelgran (Fig. 9). Klare symptomer viste seg 11 dager etter inokulering. Symptomene syntes godt på de nye skuddene som var i ferd med å vokse ut. De visnet ganske raskt (Fig. 9 venstre). På det samme skuddet ble det etter hvert dannet sporehus (pyknidier) som lett kunne sees i lupe (Fig. 9 høyre).



Fig. 9. Symptomutvikling hos fjelledelgran (*Abies lasiocarpa*) smittet med infiserte kartnåler. Venstre bilde ble tatt 28. juni, 11 dager etter inokulering. Bilde i midten og til høyre ble tatt 11 uker etter inokulering. Bilde til høyre viser dannelse av sporehus (pyknidier) på samme toppskudd. Foto: Eleonora Høst.

De andre smittemetodene viste svært lite symptomer, men ett tre utviklet symptomer som lignet CSNN (Fig. 10, venstre). Fig. 10 (høyre) viser kartnålmetoden på nordmannsedelgran. De små, brune nålene hadde trolig vokst ut etter at smitten var påført.



Fig.10. Klorose og nekrose på nåler av fjelledelgran (*Abies lasiocarpa*) penslet med sporer av *Sydowia polyspora* (venstre). Abnorme nåler og ubrutte knopper etter inokulering av nordmannsedelgran (*A. nordmanniana*) med infiserte kartnåler (høyre), Bildene ble tatt 6. september 2011 av Eleonora Høst.



Fig.11 Reisolat av *Sydowia polyspora* fra vevsbitene som ble tatt fra plantene som hadde blitt smittet med de ulike smittemetodene, fra venstre mot høyre; 1 penslet, 2 kartnåler og 3 pensling etter napping av nåler. Bilde ble tatt 23. september 2011 (ni dager etter isolering). Foto: Eleonora Høst



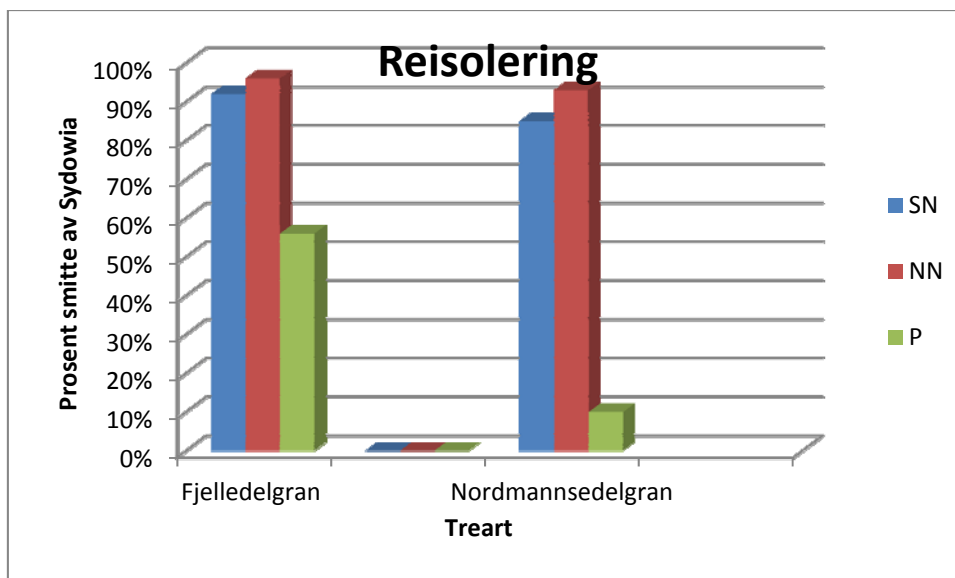


Fig.12 Prosentandel inokuleringspunkt med *S. polypora* der soppen ble reisolert fra fjelledelgran (*Abies lasiocarpa*) og nordmannsedlegran (*Abies nordmanniana*) etter bruk av disse smitte metodene; SN= infiserte kartnåler satt i skuddet, NN= nappet nåler pluss pensling med kultur, P= penslet med kultur direkte på nye skudd.

En stor andel av plantebitene det ble reisolert fra ga utslag for *S. polypora* (Figur 11). Skålene ble registrert og soppen identifisert ca. 4-6 dager etter reisolering. Metodene SN (infiserte kart nåler satt i skuddet) og NN (nappet nåler pluss pensling med kultur) ga størst andel soppinfiserte plantebiter, mens P (penslet med kultur direkte på nye skudd) ga lave verdier for reisolering av *S. polypora* (Figur 12). Der var også symptomene veldig svake, eller man kunne ikke se noen reaksjon i det hele tatt.

Ingen nåler fra kontrollplantene var soppinfiserte tre uker etter utlegging på PDA agar.

## 5 Diskusjon

Selv om frøpartiene som inngikk i beiseforsøkene ble valgt fordi de var infiserte med *S. polypora*, og ikke fordi de var aktuelle som juletrær, er det grunn til å anta at beisemidlene vil ha tilsvarende effekt på andre bartrefrø. Basert på disse testene er spesielt Signum og eddiksyre aktuelle som beisemidler for frø til oppal av juletrær.

Signum viste klart og tydelig at den hadde god effekt mot sopper. Det var bare ett av edelgranfrøene som var behandlet med Signum som var infisert med *S. polypora*, mens furufrøene var helt frie for *S. polypora*. Som tidligere nevnt er Signum et systemisk fungicid. Den gode effekten kan også ha en sammenheng med at Signum beskytter mot *S. polypora* som ligger inne i frøet.

Eddiksyre hadde i dette forsøket god effekt mot både *S. polyspora* og andre sopper på begge bartreartene. Behandlinger med planteoljer og organiske syrer gir en ikke selektiv effekt (van der Wolf *et al.* 2008), det betyr at disse metodene kan brukes mot ulike mikroorganismer. Eddiksyre har også i følge van der Wolf *et al.* (2008) en sopphekkende effekt på frø. Tidligere forsøk har vist at eddiksyre effektivt kontrollerer stinksot (*Tilletia tritici*) (Borgen & Nielsen 2001) i ulike planter.

Resultatene fra frøbehandlingene ble ikke helt som forventet for noen av leddene. Behandling med Mycostop gav høy andel av *S. polyspora* på frøene, i noen gjentak faktisk høyere enn i kontroll leddet. Mycostopen hadde heller ingen effekt på *Penicillium* i dette forsøket, da antall kolonier var like høy som på den ubehandlede kontrollen. Manglende effekt av Mycostop understøttes av andre rapporterte forsøk. Mycostop hadde i et feltforsøk liten effekt mot *Alternaria dauci* på naturlig infisert frø (Hermansen *et al.* 19. Videre er det rapportert at Mycostop testet mot *Alternaria* på gulrotfrø ikke så ut til å øke antall friske spirer (Koch *et al.* 2010). En av grunnene til dårlig effekt kan være at Mycostop sannsynligvis beskytter den ytre delen av frøet, og har en viss beskyttelse etter at frøet er plantet, men at det kanskje ikke virker systemisk ved spiring.

Der *Penicillium* spp. opptrådte sammen med *S. polyspora*, så *Penicillium* ut til å undertrykke *S. polyspora*. Den store mengden *Penicillium* på edelgranfrøene kan skyldes dårlige forhold før/under sanking eller under transport og lagring.

Når det gjelder spireprosenten viser resultatene at de ulike behandlingene ikke hadde så stor effekt på spireevnen til furufrøene (tabell 4), siden flere ligger på nivå med den ubehandlede kontrollen.

Spireevnen til edelgranfrøene lå for alle leddene lavere enn kontrollen, men spireprosenten for kontroll leddet var også lavere for edelgran enn furu. Dette kan tyde på dårlig kvalitet på frøpartiet av edelgran sammenlignet med frøpartiet av furu, men edelgranfrøene kan også ha blitt negativt påvirket av stratifiseringsprosessen de var gjennom før spiretesten. I beiseforsøket kan det se ut som at det var mer gråskimmel på de stratifiserte edelgranfrøene, spesielt på behandlingen med Signum, som hadde en mye høyere andel gråskimmel enn kontrollen. Det er kjent at gråskimmel kan sporulere ved både lave og høye temperaturer (8 – 26 °C, også høyere). Men soppen kan også vokse ved lave temperaturer, spesielt under kjølelagring (Nef & Perrin 1999).

I behandlingen av edelgranfrø med 5 % konsentrasjon av timianolje, var ingen av frøene spiredyktige i spiretesten. Det kan ha en klar sammenheng med timianoljens fytotoksisitet, og det er derfor i følge Koch *et al.* (2010) viktig å velge optimal konsentrasjon ved behandling. Tidligere tester av frøbeising med 1 % timianolje i vann viste gode resultater mot enkelte sopper som finnes på frø (Koch *et al.* 2010). Det gjorde det også her, men det hjelper lite når frøene ikke er spiredyktige. Selv om furufrøene som var

behandlet med timianolje var levende (påvist under tetrazoliumtesten), kan vi ikke forklare hvorfor de forble uspirte. Grunnen til den dårlige spireevne etter behandling med timianolje kan kanskje relateres til behandlingens lengde. Selv om frøene bare lå i oljefortynningen i fem minutter, ble en hinne liggende på frøet etterpå. Kanskje dette burde vært skylt bort med autoklavert vann. Et forsøk van der Wolf *et al.* (2008) gjorde, hvor spireevnen til kålfrø (*Brassica oleracea*) som var behandlet med ulike konsentrasjoner av timianolje ble testet, viste nemlig at spireevnen ble lite redusert når konsentrasjonen av oljen økte (ikke signifikant forskjell), men at behandlingstiden derimot påvirket spireevnen. Behandling i 1 time resulterte i at frøene ble ødelagt (fytotoksisk effekt).

Smittetesten eller patogenitetstesten viste at den metoden som etterlignet det naturlige, dvs der planten ble penslet med inokulum, viste mindre symptomer og lavere andel infeksjon enn der det ble såret med kartnåler. Testen der såring med kartnåler ble brukt viser at soppen er avhengig av en inngangsport for å gjøre stor skade. Slike inngangsporter sørger naturen ofte for ved hjelp av både abiotiske og biotiske faktorer (mekanisk skade på grunn av pisking i vind, hagl, insektstikk o.a.). Resultatene fra reisolering viser likevel tydelig at soppen også hadde overlevd der det ikke var såret med kartnåler (Fig. 10), og symptomer var fraværende eller svake. Dette tyder på at soppen kan være til stede/overleve uten sår og slå til når sår måtte oppstå. Fig. 11 viser at soppen vi fant etter reisoleringene fra de ulike plantedelene var lik isolatet vi brukte til å smitte med (Fig. 5). Dette ble bekreftet ved mikroskopering.

Enkelte ganger kan patogene endofytter leve lenge i en plante uten å synlig påvirke planten (asymptomatisk), for så å bryte ut hvis planten blir utsatt for uheldige fysiologiske forhold (Sieber 1989). Noen patogener, spesielt på bartrær, kan oppføre seg nettopp slik (Sieber 1989). Som nevnt under 2.3 er *S. polyspora* rapportert som endofytt. Dette kan være en grunn til at Sclerophoma-skade blusser opp når de fysiologiske forholdene ligger til rette for patogenet; sår etter formklipping, frost skade eller annet. Sieber (1989) viste at det var like stor andel *H. dematoides* (som tidligere nevnt er dette et synonym til *S. polyspora*) i både friske og syke grener av edelgran. Spørsmålet er om dette kan reduseres dersom *S. polyspora* elimineres fra frøene ved beising og utplantingsplantene dermed blir frie for soppen.

ITS sekvenseringen av rDNA ga mer eller mindre svar på de uidentifiserte soppene (Tabell 3). De fleste hadde en sekvenslikhet opptil 100 % med isolater av forskjellig sopper som har blitt rapportert til GenBank. Dersom det bare er noen få prosent som skiller, kan man regne med at det er snakk om samme art. Når det er lavere sikkerhet, er det vanskelig å si at det er samme arten, men de muligens kan være i slekt. Mange sopper ligger heller ikke registrert i database ennå. Dessuten kan feilregistreringer forekomme der. Noen av soppartene fra furufrøene som ble identifisert ved sekvensering viste seg å

være kjukedannende sopper. Mens andre var sopper som lever naturlig i et skogsamfunn uten at de er kjent som patogener.

Det var overraskende å finne *Heterobasidium* sp. som frøoverført på et furufrø (leddet med eddiksyrebehandling). *H. annosum* (rotkjuke) er som nevnt under 2.3 et patogen som kan komme til å bli et problem for norske juletre dyrkere. I en spireanalyse utført av Batko (1957) ble det rapportert funn av *Heterobasidium annosum* på frø av *Abies* spp. fra Nord-Amerika.

Blant de resterende soppene som ble identifisert ved sekvensering (Tabell 3) er det trolig ingen som er noen trusler mot juletreproduksjonen.

## 6 Konklusjon

Det viktigste tiltaket mot frøoverførte sopper er å benytte seg av sykdomsfritt frø. Siden man kan behandle/beise frø på ulike måter for å redusere inokulum (Nome *et al.* 2011) er det viktig å velge riktig type frøbehandling avhengig av om soppene opptrer internt eller på overflaten. Siden all *S. polyspora* ikke lar seg fjerne med overflatesterilisering, fins soppene tydeligvis også inni frøene. Siden smitteforsøkene viste at *S. polyspora* har stort skadepotensiale på nye skudd, er det viktig å eliminere dette patogenet. Resultatene fra frøbehandlingene viste at Mycostop ikke kan brukes for å redusere frøoverførte sopper på artene vi testet. På grunn av den fytotoksiske effekten kan heller ikke timianolje anbefales, selv om den hadde svært god effekt mot soppene. Eddiksyre hadde god effekt mot soppvekst, men for å få bukt med smitten både inni og utenpå frøene vil vi, på grunnlag av resultatene som er rapporterte her, anbefale bruk av Signum som beisemiddel på frø til juletrær.

## Litteraturliste:

- Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. 5. utg. Elsevier Academic Press. USA. 922 s.
- Anonym (2007). Edelgran. <http://sabima.no/sider/tekst.asp?side=424>.
- Anonym (2011a). Index Fungorum (2011). <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>
- Anonym. (2011b). Juletreet, Hedmark og Oppland juletre- og pyntegrøntlag. Ugraskontroll, Kap.8. S. 1-10. <http://www.juletreet.no/dok/ugraskontroll%20og%20skader.pdf>.
- Anonym. (2011c). Norsk Botanisk Forening. Gran. <http://www.botaniskforening.no/index.php/hardusett/148-gran.html>.
- Anonym. (2011d). Norsk Pyntegrønt. <http://www.norskpyntegrønt.no/default.pl?showPage=213>.
- Batko, S. (1957). Review of Applied Mycology 38: 711-716.
- Boerema, G. H., de Gruyter, J., Noordeloos, M. E. & Hamers, M. E. C. (2004). *Phoma* Identification Manual. CABI Publishing, UK. 470 s.
- Borgen, A. & Nielsen, B. J. (2001). Effect of seed treatment with acetic acid for control of seed borne diseases. I: Biddle, A. J. (red.) British Crop Protection Council Symposium Proceedings, Seed Treatment: Challenges & Opportunities. British Crop Protection Council. S. 135-140.
- Botella, L. & Diez, J. J. (2011). Phylogenic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. Fungal Diversity 47: 9-18.
- Brown, A. & Macaskill, G. (2005). Shoot Diseases of pine. 6 s. [http://www.forestry.gov.uk/pdf/FCIN068.pdf/\\$FILE/FCIN068.pdf](http://www.forestry.gov.uk/pdf/FCIN068.pdf/$FILE/FCIN068.pdf)
- Butin, H. & Pehl, L. (1993). *Kabatina-abietis* sp-nov, associated with browning of fir needles. Mycological Research 97: 1340-1342.
- Butin, H. (1995). Tree diseases and disorders: causes, biology, and control in forest and amenity trees. Oxford University Press, USA. 252 s.
- Callan, B. (2001). Introduction to forest diseases. Pacific Forestry Centre, Canada. Forest pest leaflet nr. 54. 13 s.
- Camacho, F. J., Gernandt, D. S., Liston, A., Stone, J. K. & Klein, A. S. (1997). Endophytic fungal DNA, the source of contamination in spruce needle DNA. Molecular Ecology 6: 983-987.
- Chastagner, G. (1997). Christmas tree diseases, insects & disorders in the Pacific Northwest: Identification and management. Washington State University Cooperative Extension. 154 s.
- Chastagner, G. & Benson, D. M. (2000). The Christmas tree: Traditions, production and diseases. 14 s. Doi: 10.1094/PHP-2000-1013-01-RV. <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/1225tree/>

- Christensen, L. B. L. (2008). Røde nåle i nordmannsgran og nobilis.  
<http://www.skovdyrkerne.dk/dyrkningsaktuelt/juletraerogklippegroent/skader/svampeskader/roedenaaleinordmannsgranognobilis/>.
- Cram, M. M. & Freadrich, S. W. (2011) Seed diseases and seedborne pathogens of North America. *Tree Planters` Notes* 53 (2): 35-44.
- Crous, P. W. & Groenewald, J.Z. (2010). *Anthostomella pini*. *Persoonia* 25: 126-127.
- Dal Bello, G. & Sisterna, M. (2010). Use of Plant Extracts as Natural Fungicides in the Management of Seedborne Diseases I: Arya, A. & Perello, A. E. (red.) *Management of Fungal Plant Pathogens*. Cabi Publishing, UK. S. 51-66.
- Deacon, J. W. (2005). *Fungal Biology*. 4. utgave. Wiley-Blackwell. 371 s.
- Freadrich, S.W. (2009). Seedborne Pathogens and Strategies to Eliminate and Reduce their Presence on Tree Seeds. 5 s. [www.apsnet.org/online/proceedings/ExoticPest/Papers/Fraedrich.htm](http://www.apsnet.org/online/proceedings/ExoticPest/Papers/Fraedrich.htm)
- Ganley, R. J. & Newcombe, G. (2006). Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycological Research* 110: 318-327.
- Harrison, K. J. (2009). Forest disease records on eastern white pine in Atlantic Canada: 1950 to 1996. *Forestry Chronicle* 85: 604-608.
- Hauge, A. E. R. (2011). Stor interesse for å auke juletre dyrking i Rogaland.  
[http://www.regjeringen.no/nb/dep/lmd/dok/tidsskrift\\_og\\_nyhetsbrev/fylkesnytt/2010/fylkesnytt-fra-rogaland-22010.html?id=619550#juletre dyrking \(lest 2010\)](http://www.regjeringen.no/nb/dep/lmd/dok/tidsskrift_og_nyhetsbrev/fylkesnytt/2010/fylkesnytt-fra-rogaland-22010.html?id=619550#juletre dyrking (lest 2010)).
- Hermansen, A., Brodal, G. & Balvoll, G. (1999). Hot water treatments of carrot seeds: effects on seed-borne fungi, germination, emergence and yield. *Seed Science and Technology* 27: 599-613.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lucking, R., *et al.* (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509-547.
- Jansen, J. A. (1993). Juletreproduksjon. *Fagnytt hagebruk*, nr. 8, 1993. Statens fagtjeneste for landbruket, Norge. 4 s.
- Klaric, M. S., Kosalec, I., Mastelic, J., Pieckova, E. & Pepeljnak, S. (2007). Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters in Applied Microbiology* 44: 36-42.
- Koch, E., Schmitt, A., Stephan, D., Kromphardt, C., Jahn, M., Krauthausen, H. J., Forsberg, G., Werner, S., Amein, T., Wright, S. A. I., Tinivella, F., Gullino, M. L., Roberts, S. J., van der Wolf, W. J., Groot, S. P. C. (2010). Evaluation of non-chemical seed treatment methods for the control of *Alternaria dauci* and *A. radicina* on carrot seeds. *European Journal of Plant Pathology* 127: 99-112.
- Kolotelo, D., Van Steenis, E., Peterson, M., Bennett, R., Trotter, D. & Dennis, J. (2001). *Seed Handling Guidebook*. British Columbia. Ministry of Forests, Canada. 106 s.

- Kritzinger, Q., Aveling, T. A. S. & Marasas, W. F. O. (2002). Effect of essential plant oils on storage fungi, germination and emergence of cowpea seeds. *Seed Science and Technology* 30: 609-619.
- Littke, W. R. (2011). *Seed Fungi*. 3 s.  
[http://www.google.no/url?sa=t&rct=j&q=seed%20fungi%20%2B%20littke&source=web&cd=1&ved=0C CYQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.rngr.net%2Fpublications%2Fghs%2Fseed-fungi%2Fat\\_download%2Ffile&ei=B4zkTviqGqeB4ASjodT9BA&usg=AFQjCNH8Fa38psXKCw2NqOvdqDoDXaisZQ](http://www.google.no/url?sa=t&rct=j&q=seed%20fungi%20%2B%20littke&source=web&cd=1&ved=0C CYQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.rngr.net%2Fpublications%2Fghs%2Fseed-fungi%2Fat_download%2Ffile&ei=B4zkTviqGqeB4ASjodT9BA&usg=AFQjCNH8Fa38psXKCw2NqOvdqDoDXaisZQ)
- Malone J. P. & Muskett, A. E. (1997). Seed-borne fungi. Description of 77 fungus species. 3<sup>rd</sup> ed. ISTA. The International Seed Testing Assosiation, Sveits. 191 s.
- Martin, K. J. & Rygiewicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *Bmc Microbiology* 5: 28. Doi: 10.1186/471-2180-5-28.
- Muller, M. M., Valjakka, R., Suokko, A. & Hantula, J. (2001). Diversity of endophytic fungi of single Norway spruce needles and their role as pioneer decomposers. *Molecular Ecology* 10: 1801-1810.
- Nef, L. & Perrin, R. (1999). Damaging agents in European Forest Nurseries. Practical handbook. European Communities, Italia. 352 s.
- Nome, S. F., Barreto, D. & Docampo, D. M. (2011). Seedborne Pathogens. 13 s.  
<http://www.seedconsortium.org/PUC/pdf%20files/22-%20Seed%20associated%20pathogens.pdf>
- Nyeggen, H., Skage, J.-O. & Østgård, Å. (2010). Juletrekvaliteter i edelgran frå Europa, Asia og Nord-Amerika. *Forskning fra Skog og landskap*, 2/10. Norsk institutt for skog og landskap. 19 s.
- Nygaard, P. H. (2009). Vanlig edelgran. *Artsdatabankens faktaark* 103: 2 s.
- Pelaez, F., Cabello, A., Platas, G., Diez, M. T., del Val, A. G., Basilio, A., Martan, I., Vicente, F., Bills, G. F., Giacobbe, R. A., *et al.* (2000). The discovery of enfumafungin, a novel antifungal compound produced by an endophytic *Hormonema* species biological activity and taxonomy of the producing organisms. *Systematic and Applied Microbiology* 23: 333-343.
- Perello, A. & Sisterna, M. (2008). Formation of *Lewia infectoria*, the teleomorph of *Alternaria infectoria*, on wheat in Argentina. *Australasian Plant Pathology* 37: 589-591.
- Pirttilä, A. M., Pospiech, H., Laukkanen, H., Myllylä, R. & Hohtola, A. (2003). Two endophytic fungi in different tissues of Scots pine buds (*Pinus sylvestris* L.). *Microbial Ecology* 45: 53-62.
- Pundsnes, T. (2011). Juletre dyrking - ei spennande næring med stort utviklingspotensiale. 2 s.  
<http://www.google.no/url?sa=t&rct=j&q=einer%20og%20kristtorn%20som%20juletre&source=web&cd=1&ved=0CCIQFjAA&url=http%3A%2F%2Fvestlandet.lfr.no%2Fdocs%2F0000F08.doc&ei=jXauTtvjlqaB4gTWsoyeDw&usg=AFQjCNEOIZsHqv0brZrDyiJoCrF2XtQYSA>
- Roll-Hansen, F. & Roll-Hansen, H. (1993). Sykdommer på skogtrær. Landbruksforlaget, Norge. 120 s.
- Sandved, M., Andersson, J. & Batta, J. (1998). Vinterdendrologi - trær og busker om vinteren. Landbruksforlaget, Norge. 168 s.

- Sieber, T. N. (1989). Endophytic fungi in twigs of healthy and diseased Norway spruce and white fir. *Mycological Research* 92: 322-326.
- Sieber, T. N. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews* 21 : 75-89.
- Singh, P. (1996). Tree seed pathogens and seed diseases: their detection and management in sustainable forestry. Proceedings tree seed pathology meeting, Opocno, Tsjeckia. ISTA. S.9-22.
- Skage, J. O. (2007). Juletreproduksjon på sørvestlandet. *Skog og landskap*. 4 s.  
<http://www.skogoglandskap.no/filearchive/juleviten-02-2007-12.pdf>.
- Skage, J. O., Østgård, Å. & Øyen, B. H. (2007). Fraseredelgran: nytt lovende juletre i Norge. *Skog og landskap*, Glimt nr. 04, 2 s.
- Skage, J.-O. (2009). Fjelledelgran: viktig med norsk foredlet frø til juletrær. *Skog og landskap*, Glimt nr. 10, 2 s.
- Skage, J. O. (2011). Forskjellige treslag og klimaraser som juletrær. 2 s.  
[http://www.skogoglandskap.no/fagartikler/2010/forskjellige\\_treslag\\_og\\_klimaraser\\_som\\_juletraer](http://www.skogoglandskap.no/fagartikler/2010/forskjellige_treslag_og_klimaraser_som_juletraer).
- Smith, I. M. (1988). *European handbook of plant diseases*. Blackwell Scientific Publications, UK. 583 s.
- Sokovic, M. D., Vukojevic, J., Marin, P. D., Brkic, D. D., Vajs, V. & van Griensven, L. (2009). Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* Species and their antifungal activities. *Molecules* 14: 238-249.
- Solberg, S. (2007). Klimaendringer kan gi mer skogskader. *Skog og landskap*, Glimt nr. 01, 2 s.
- Solberg, S. & Dalen, L. S. (2007). Effekter av klimaendring på skogens helsetilstand, og aktuelle overvåkingsmetoder. 46 s.
- Solbraa, K. (2001). Om treslag i norsk skog. <http://www.agropub.no/id/9737>.
- Solheim, H. (2007). Juletreproduksjon. Skader og sykdommer. 5 s.  
<http://www.skogoglandskap.no/filearchive/solviten-02-2007-13.pdf>
- Storheim, A. B. (1997). *Håndbok i pyntegrønt: treaktige planteslag for pyntegrøntproduksjon i Norge*. Norsk pyntegrønt. Fagsenter. 182 s.
- Sutherland, J. R., Miller, T. & Quinard, R. S. (1987). *Cone and Seed Diseases of North American Conifers*. North American Forestry Commission, pub.no.1, Canada77 s.
- Sutton, B. C. & Waterston, J. M. (1970). *Sydowia polyspora*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. No. 228. Set No. 23.
- Sæbø A. & Pundsnes T. (2009). Gjødsling av juletrær. *Bondevennen* nr. 44. 2 s.  
<http://www.bondevennen.no/arkiv/fagartiklar/2009/fagsak4409.html>
- Talgø, V. & Stensvand, A. (2005). Er soppsjukdomar nokon trussel for juletreproduksjonen av edelgran? *Grønn Kunnskap* 9 (2): 7 s.



- Talgø, V., Herrero, M. L., Toppe, B., Klemsdal, S. S. & Stensvand, A. (2007.) Phytophthora root rot and stem canker found on nordmann and subalpine fir in Norwegian Christmas tree Plantations. Plant Health Progress. Doi: 10.1094/PHP-2007-0119-01-RS. 7 s.
- Talgø, V., Brodal, G., Klemsdal, S. S. & Stensvand, A. (2010a). Seed borne fungi on *Abies* spp. Seed Science and Technology 38: 477-493.
- Talgø, V., Chastagner, G., Thomsen, I. M., Cech, T., Riley, K., Lange, K., Klemsdal, S. S. & Stensvand, A. (2010b). *Sydowia polyspora* associated with current season needle necrosis (CSNN) on true fir (*Abies* spp.). Fungal Biology 114: 545-554.
- Talgø, V. (2009). Diseases and disorders on fir grown as Christmas trees, boughs, and landscape plants in Norway; from seed to site. PhD thesis 2009: 28. Norwegian University of Life Science. 174 s.
- Talgø, V., Dobson, A., Slørstad, T., Brurberg, M. B. & Stensvand, A. (2011). *Sclerophoma*-skade på juletre. Nåledrys 75/11: 28-20.
- Van der Wolf, J. M., Birnbaum, Y., Van der Zouwen, P. S. & Groot, S. P. C. (2008). Disinfection of vegetable seed by treatment with essential oils, organic acids and plant extracts. Seed Science and Technology 36: 76-88.
- Whittle, A. M. (1977). Mycoflora of cones and seeds of *Pinus sylvestris*. Transactions of the British Mycological Society 69: 47-57.
- Zhdanova, N. N., Zakharchenko, V. A., Vember, V. V. & Nakonechnaya, L. T. (2000). Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor. Mycological Research 104: 1421-1426.



# Signum®

Mot soppsykdommer i kirsebær, plomme, jordbær, bringebær, solbær, bjørnebær, rips, hodekål, rosenkål, blomkål, brokkoli, gulrot, persille, pastinak, kålrot, nepe, kepaløk, sjalottløk, vårløk, salat, ruccola, erter og bønner. Preparatet er kun tillatt på friland.

Sammensetning: Boscalid ..... 267 g/kg  
Pyraclostrobin ..... 67 g/kg

**Farlig ved svelging.**  
**Mulig fare for fosterskade.**  
**Meget giftig for vannlevende organismer, kan forårsake uønskede langtidsvirkninger i vannmiljøet.**  
**Må ikke brukes nærmere vannførende grøfter, bekker, dammer eller større vannforekomster enn 30 meter i frukt og 5 meter i resterende kulturer.**  
**Oppbevares innelåst og utilgjengelig for barn. Bruk egnet verneutstyr (se forsiktighetsregler)**  
**Uskadeliggjør tomemballasjen (se avfallshåndtering)**



Helsekadelig



Miljøskadelig

Avgiftsklasse: 2

**Behandlingsfrist:**

Jordbær: 3 dager

Kirsebær, bærbusker, kepaløk, sjalottløk, salat, ruccola, kålrot, nepe: 7 dager.

Plomme, blomkål, brokkoli, hodekål, vårløk, gulrot, rotpersille, bladpersille, pastinakk, kruspersille, ert: 14 dager

Rosenkål og bønne: 21 dager.

**Tilvirker:**  
**BASF SE,**  
**Ludwigshafen, Tyskland**

Reg. Nr.: 2007.133.09

Nettoinnhold: **2,5 kg**

® = Registrert varemerke for BASF

**Importør:**  
**BASF AS**  
**Leangbukta 40**  
**Postboks 233**  
**1372 Asker**  
**Tel 66 79 21 00**

Batch nr.: Se emballasjen  
Produksjonsdato: Se emballasjen

**Oplysninger i Nødtilfelle:**  
**Giftinformasjonen tlf: 22 59 13 00**  
**BASF Vakt telefon: 0049 180 2273 112**



81059544 NO 1091-Norway

**Signum®**

**Bruksrettleddningen må følges, slik at man unngår risiko for menneske og miljø. Det er forbudt å bruke Signum i strid med godkjent bruksområde eller behandlingsfrist, eller å overskride den tillatte maksimale dosering/konsentrasjon.**

**Bruksområde**

Mot soppsykdommer i kirsebær, plomme, jordbær, bringebær, solbær, bjørnebær, rips, hodekål, rosenkål, blomkål, brokkoli, gulrot, rotpersille, pastinak, kålrot, nepe, kepaløk, sjalottløk, vårløk, salat, ruccola, kruspersille, bladpersille, erter og bønner. Preparatet er kun tillatt på friland.

**Virkeområde**

Signum er spesielt virksomt overfor sykdommer forårsaket av ulike arter innenfor soppslektene Alternaria, Sclerotinia, Botrytis og Monilinia. De to aktivstoffene har hver sin virkemåte og virker på den måten som sikring mot utvikling av resistens. Strobiluriner og strobilurin-holdige produkter kan bare brukes to ganger pr hold eller sesong.

**Virkemåte**

Signum er et bredspekret og systemisk fungicid med virkning overfor en lang rekke sykdommer i frukt, bær og grønnsaker.

**Resistens**

Signum bør primært brukes forebyggende i de forskjellige kulturer. Det gir den sikreste virkningen - og er dessuten en ytterligere sikring mot utvikling av resistens.

**Bruksrettleddning**

**Korsblomstra grønnsakvekster; hodekål, rosenkål, blomkål, brokkoli.**

- mot skulpesopp, korsblomstråflekk, korsblomstring-flekk, korsblomst-hvitrust, korsblomstmeldugg, og viss virkning mot storknolte råtesopp og gråskimmel.

I korsblomstra grønnsakvekster brukes 100 g/daa i 30 liter vann. I meget tette kulturer kan det være en fordel å sette vannmengden vesentlig opp - inntil 100 l/daa. Det gir en større sikkerhet for god dekning. Signum har best virkning som forebyggende behandling eller så tidlig etter begynnende angrep som mulig.

Behandling gjentas med 2-3 ukers intervall avhengig av sykdomsgrad.

**Gulrot - persille (krus-, blad- og rot-) kålrot, nepe og pastinak.**

- mot gulrotbladflekk (Alternaria og Cercospora), persillebladflekk, meldugg og en viss virkning mot storknollet råtesopp, gråskimmel, klossopp og gulrothvitflekk

Mot de nevnte sykdommer i skjermplantene er doseringen 100 g/daa i 20 - 40 liter vann med væskemengde avhengig av bladmassen.

Behandlingen startes ved begynnende angrep i feltet. Det følges opp etter 2 uker, - alt etter behov. Mot lagringsjukdommer er første behandlingstid i juli/august.

**Erter og bønner**

- mot gråskimmel, storknollet råtesopp, ertemeldugg og en viss virkning mot erthebladskimmel

Ved fare for angrep sprøytes første gang ved begynnende blomstring (eller første sykdomsteget med 100 g/daa i 20 - 40 l vann/daa). Ved behov for en supplerende behandling skal dette skje 7 - 14 dager senere.

**Salat og ruccola**

- mot gråskimmel, storknollet råtesopp og en viss virkning mot svartskurv  
I salat brukes forebyggende 100 g/daa i 30-50 liter vann pr daa.

Signum kan brukes i 2 forebyggende behandlinger med 7 -14 dagers intervall eller inngå i behandlingsprogram med produkter med annen virkemåte.

**Vårløk**

- mot lokgråskimmel, purregråskimmel, løkbladgråskimmel, løkbladflekk, purpurflekk og en viss virkning mot rust, papirflekk og løkbladskimmel

Mot de nevnte sykdommene benyttes 100 g/daa i 30-50 liter vann /daa ved begynnende angrep. De 2 behandlingene kan gjøres med 10-14 dagers intervall, eller inngå i behandlingsprogram med produkter med annen virkemåte.

**Løk**

mot løkbladgråskimmel, gråskimmel, løkbladflekk  
Mot nevnte sykdommer i løk anvendes 1,0 kg/ha i 300 - 500 l vann pr. ha ved begynnende angrep. Behandlinger kan utføres med 5 - 10 dagers intervall. Maksimalt 2 behandlinger.

**Steinfrukt (kirsebær og plomme)**

- mot grå - og gul monilia, bitteråte og heggeflekk  
Normalkonsentrasjonen er 100 g til 100 liter vann. Normalvæskemengde er 150 liter/daa, tilsvarende 75 liter pr. 100 m trekk (etter blomstring i utvokst slank spindelplanting). I steinfrukt passer Signum best med 2 behandlinger i blomstringsperioden, fra begynnende blomstring og med gjentatt sprøyting etter 5 - 10 dager.

**Jordbær på friland**

- gråskimmel, jordbærvæppestek og meldugg  
Signum vil også ha virkning mot jordbærsvartflekk og læråte. Normalkonsentrasjonen er 100 g til 100 liter vann. Normalvæskemengde er 100 liter til 1000 m enkeltråd. Væskemengden vil avhenge av bladmassen og skal sikre en god dekning av blader og bær under utvikling. Signum benyttes forebyggende med første behandling ved begynnende blomstring. En etterfølgende behandling kan skje 10 - 14 dager etter. Signum skal ikke brukes mer enn 2 ganger pr. sesong.

**I bringebær, solbær, bjørnebær og rips**

- Gråskimmel, meldugg, filtrust og skivesopp  
- Bevaring av bladmateriale etter høsting  
I solbær, rips, bjørnebær og bringebær fra begynnende blomstring og inntil 7 dager før høsting, i en vannmengde (f.eks. 200 - 400 l/ha) som er tilstrekkelig for å sikre en god dekning av blader og bær. Maksimalt 1-2 behandlinger for høsting. Etter høst: (1,0 kg/ha) 0,1 kg/daa, maksimalt 1 behandling. Maksimalt 2 behandlinger pr. sesong.

**Før høsting**

Normalkonsentrasjonen er 150 g til 100 liter vann. Normal væskemengde er 60 liter pr. 100 m enkeltråd.

**Efter høsting**

Normal konsentrasjonen er 100 g til 100 liter vann. Normal mængde er 60 liter pr. 100 m enkeltråd.

**Tilberedning av sprøytevæsken**  
Etter å ha fylt tanken halv full med rent vann startes omrøring. Den ønskede mengden produkt tilsettes, og tanken fylles opp med vann.

Sprøytevæsken sprøytes ut straks etter tilberedningen.

**Blandingsmuligheter**

Signum kan blandes med Candit, Delan WG , Scala, Fastac 50.

**Lagring**

Signum bør oppbevares frostvritt i uåpnet og uskadet originalemballasje.

**Forsiktighetsregler**

Bruk vernehansker av nitril gummi, støvler og overtrekksdress ved håndtering og bruk av preparatet. Ved langvarig sprøyting og når det er fare for innånding av sprøyteåke, skal overtrekksdress og halvmaske med kombinasjonsfilter A1/P2 anvendes. Søl av preparatet på hud må straks skylles eller vaskes av. Klær tilsølt med preparatet skal fjernes straks. Vask hender og ansikt når arbeidet er ferdig eller avbrøyt. Ved uhell eller mistanke om forgiftning kontakt lege eller Giftinformasjonen tlf. 22 59 13 00.

**Rengjøring**

Tomemballasjen skylles minst tre ganger med vann og innholdet tømmes i sprøyteanken. Rester fra sprøyteanken fortynnes omlag 5 ganger med vann og sprøytes ut i henhold til bruksrettleddningen. Skyll sprøyteutstyr med vann etter bruk på et sted som ikke gir fare for forurenning av vannforekomster. Ved skitte av preparat for sprøyting i omfintlige kulturer må sprøyteutstyret rengjøres med soda, salmiakk eller annet anbefalt vaskemiddel.

**Avfallshåndtering**

Grundig rengjort tomemballasje leveres med husholdnings-avfall eller deponeres på offentlig fyllplass. Konsentrerte plantevernmiddelrester og ikke rengjort tomemballasje må innleveres til mottak for farlig avfall.

**Resistens**

For mange sopppmidler er det en generell risiko for at det kan oppstå resistente sopptammer. Under spesielt ugunstige forhold kan man derfor ikke utelukke at det kan skje forandringer i preparatets virkning. Fordi det finnes så mange kultur- og bruksavhengige påvirkningsmuligheter er det umulig å forutsi den resistensdannelse, og vi kan derfor ikke ta ansvar for eventuelle skader som kan tilbakeføres til resistensdannelse. For å unngå at virkningen svekkes er det absolutt nødvendig å holde seg til den mengde preparat som BASF har anbefalt, og vekse med andre midler som har annen virkemåte.

**MERK.**

Det er mange faktorer som kan ha innflytelse på produktets virkning, spesielt steds- eller regionsbetingede faktorer. Herunder hører for eksempel vær- og jordforhold, kulturplantesorter, vekselbruk, behandlingstidspunkt, anvendt mengde, blanding med andre produkter, forekomst av resistente organismer, sprøyteknikk 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.

® = Registrert varemerke for BASF

81059544 NO 1091-Norway

# MYCOSTOP®

## BIOFUNGICID

**Mot soppsykdommer i prydplanter, tomat og agurk i veksthus samt frøbeising av grønnsaker, krydder og prydplanter i veksthus.**

**Sammensetning:** Mycel og sporer av *Streptomyces* K61: 420 ±70 g/kg

Fyllstoffer: Opp til 1 kg

Mycostop inneholder 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> kolonidannende enheter (cfu) pr. gram. Vannløselig pulver.

### ADVARSEL



HELSEKADELIG

Kan gi allergi ved innånding og hudkontakt. Unngå innånding av støv og sprøytetåke. Unngå hudkontakt. Oppbevares innelåst og utilgjengelig for barn. Bruk egnet verneutstyr (se forsiktighetsregler). Uskadeliggjør tomembalansen (se avfallshåndtering).

### BEHANDLINGSFRIST:

Agurk og tomat: 4 dager

### AVGIFTSKLASSE 2

Bruksrettledningen må følges, slik at man unngår risiko for mennesker og miljø. Det er forbudt å bruke preparatet i strid med godkjent bruksområde eller behandlingsfrist, eller å overskride den tillatte maksimale dosering/konsentrasjon.

**Tilvirker: Verdera Oy**  
Esbo, Finland

**Importør: Granli Planteskole**  
2210 Granli  
tlf. +47 62 82 71 50  
[www.granliplanteskole.no](http://www.granliplanteskole.no)

® Reg. varemerke: Verdera Oy, Esbo, Finland

REG. NR: 2008.103

Nettoinnhold (g): 5 x 1 g e  
1 x 5 g e

051208

### BRUKSOMRÅDE

Prydplanter, tomat og agurk i veksthus. Frøbeising av grønnsaker, krydder og prydplanter i veksthus.

### VIRKEMÅTE

*Streptomyces* K61 er en jordmikrobe (Actinomycetes) isolert fra en myr i Finland.

Når MYCOSTOP blir tilført på fuktig jord/vekstmedium, vil *Streptomyces* raskt begynne å vokse. Den etablerer seg i en sone rundt røttene, og vil dermed konkurrere med patogene sopper om både plass og næring. *Streptomyces* skiller også ut antibiotiske stoffer som hemmer veksten av patogene sopper. MYCOSTOP har samtidig en vekstfremmende effekt på planten. MYCOSTOP har i hovedsak en forebyggende virkning mot sykdommer.

### BRUKSRETTLEDNING

MYCOSTOP brukes i første rekke til sprøyting eller vanning av vekstmediet. Produktet kan også doseres gjennom dryppvanning. MYCOSTOP må ikke blandes i gjødselstamløsningen eller brukes i tankblanding med andre plantevernmidler. Avhengig av produkt skal det være 0-4 dagers mellomrom mellom MYCOSTOP behandlingen og behandling med et annet plantevernmiddel.

Doseringen avhenger av mengden av dyrkingssubstrat, rotstørrelse og sykdomspress. Den laveste dosering anvendes til små pletter med lite rotvolum, og den høyeste dosering til store pletter med stort rotvolum. Doseringen bør dessuten avpasses etter smittepresset.

Behandlingen skal gjentas med 4-8 ukers mellomrom.

### Tillaging av sprøytevæske

Ved dypping, sprøyting og vanning må MYCOSTOP først blandes ut med litt (ca. 0,5 liter) vann. La denne pulver/vann-oppløsningen stå i en halv times tid før den tilsettes vann opp til anbefalt brukskonsentrasjon.

Ferdig oppløsning skal brukes samme dag.

0,01 % oppløsning = 1 gram MYCOSTOP pr. 10 liter vann

0,05 % oppløsning = 5 gram MYCOSTOP pr. 10 liter vann

### Småplanter, stiklinger og blomsterløk

Ved produksjon av småplanter behandles vekstmediet med MYCOSTOP ved sprøyting eller vanning. Bruk 2-10 g MYCOSTOP pr. 100 m<sup>2</sup> (tilsvarende 0,01 % oppløsning 0,2-1,0 liter pr m<sup>2</sup>). Behandlingen foretas etter framspiring eller utplantning.

Vekster som oppformerer gjennom stiklinger, behandles før eller etter at stiklingene har fått røtter. Dypp stiklingene/blomsterløkene i en 0,01 % oppløsning av MYCOSTOP i noen sekunder umiddelbart for planting. Stiklingene kan også vannes (grundig) med oppløsningen.

Se baksiden!

# MYCOSTOP®

## BIOFUNGICID

### Snittblomster og potteplanter

Til bekjempelse av visnesjuka forårsaket av *Fusarium oxysporum* på snittblomster, f.eks. nellik og gerbera, og på potteplanter, f.eks. cyclamen.

Sprøyt eller vann mediets overflate med en MYCOSTOP oppløsning umiddelbart etter planting.

- Til snittblomster, ved dyrking på bedd, f.eks. torv, brukes 1-5 g MYCOSTOP pr. 100 m<sup>2</sup> (tilsvarende 0,01 % løsning 0,1–0,5 liter pr m<sup>2</sup>). Gjenta behandlingen en gang i løpet av 1–2 måneder.
- Til potteplanter og til snittblomster i avgrenset dyrkingsmedium brukes en 0,01 % oppløsning av MYCOSTOP pr. plante. Bruk 20–50 ml oppløsning pr. potte (tilsvarende 2–5 mg MYCOSTOP pr. plante).

### Agurk og tomat i veksthus

MYCOSTOP virker mot rotbrannssopper som *Fusarium* sp. og *Pythium* sp. Sprøyt/vann overflaten av vekstmediet umiddelbart etter plantering med en oppløsning av MYCOSTOP.

- På rockwool-medium benyttes en konsentrasjon på 0,05 % (5 gram MYCOSTOP pr. 10 liter vann). Bruk 10–20 ml pr. plante (tilsvarende 5–10 mg MYCOSTOP pr. plante). Oppløsning skal sprøytes/vannes på dyrkingsblokken. Gjenta behandlingen en gang i måneden gjennom hele vekstperioden.
- På torv-medium benyttes en konsentrasjon på 0,01 %. Bruk 0,1–0,3 liter pr m<sup>2</sup> (tilsvarende 1-3 g MYCOSTOP pr. 100 m<sup>2</sup>). Hele overflaten skal behandles. Gjenta behandlingen gjennom vekstperioden med 1–2 måneders mellomrom.

### Beising av frø av grønnsaker, krydder og pryddplanter

Mot spirehemnende sykdommer forårsaket av blant annet *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. og *Rhizoctonia* sp.

Oppbevar frø og uåpnede MYCOSTOP poser ca. en halv time ved romtemperatur før beising av frøet for å unngå klumpdannelse i pulveret.

Beis frøet ved å tilsette MYCOSTOP sammen med frøet i en beholder. Rist beholderen inntil frøet er dekt av det tørre pulveret. Det må ikke brukes et kjemisk beisemiddel samtidig. Så frøet snarest mulig etter beising, ikke senere enn en uke etter beisingen. Beisede frø skal oppbevares tørt og kjølig, under +8 °C.

**Merk:** Ved høy luftfuktighet kan de behandlede frø stoppe i såutløpet.

Dosering	MYCOSTOP
• Kålvkster og reddik ( <i>Brassica</i> sp.), løk purre og krydder:	pr. kg frø 8 g
• Gulrot, erter, bønner, tomat, agurk og spinat:	5 g
• Pryddplanter:	5 g
• Salat	2 g

### FORSIKTIGHETSREGLER

Bruk maske med støvfilter P3, vernehansker av nitril, øyevern og heldekkende arbeidstøy ved håndtering og bruk av preparatet og ved rengjøring av beiseutstyr.

Ved uhell eller mistanke om forgiftning kontakt lege eller Giftinformasjonen tlf. 22 59 13 00.

Anbefalt verneutstyr må nyttes dersom en går inn i behandlet område eller håndterer behandlede plantedeler i en periode på 24 timer etter sprøyting.

Unngå hudkontakt med beiset vare. Bruk hansker.

Beiset vare må ikke brukes til mat eller fôr.

Vask hender og ansikt når arbeidet er ferdig eller avbrytes.

### RENGJØRING

Tomemballasjen skylles mist tre ganger med vann og innholdet tømmes i sprøytetanken.

Rester fra sprøytetanken fortynnes omlag 5 ganger med vann og sprøytes ut i henhold til bruksrettledning.

Skyll sprøyteutstyr med vann etter bruk på et sted som ikke gir fare for forurensning av vannforekomster.

### AVFALLSHÅNDTERING

Rengjort emballasje bringes til lovlig avfallsanlegg.

Konsentrerte plantevernmidlerrester og ikke rengjort tomemballasje må innleveres til mottak for farlig avfall.

Ubenyttet beiset vare er farlig avfall og må innleveres til mottak for farlig avfall.

### LAGRING

Oppbevares tørt og kaldt, under +8 °C, i uåpnet pakning bevarer MYCOSTOP sin effekt i 12 måneder. I åpnet pakning mister MYCOSTOP sin effekt.

### MERK

Vi garanterer ikke at preparatet under alle forhold har den forventede virkning.

Bruksanvisningen er basert på forsøk og erfaringer.

# Potato Dextrose Agar • Potato Dextrose Broth

## Intended Use

Potato Dextrose Agar is used for the cultivation and enumeration of yeasts and molds.

Potato Dextrose Broth is used for cultivating yeasts and molds.

Potato Dextrose Agar meets *United States Pharmacopeia (USP)*, *European Pharmacopoeia (EP)* and *Japanese Pharmacopoeia (JP)*<sup>1-3</sup> performance specifications, where applicable.

## Summary and Explanation

Potato Dextrose Agar is a general purpose medium for yeasts and molds that can be supplemented with acid or antibiotics to inhibit bacterial growth. It is used in plate count methods when testing food,<sup>4,6</sup> dairy products<sup>7</sup> and cosmetics.<sup>5,6</sup> The *USP* lists Potato Dextrose Agar as one of the recommended media for use in the Microbial Enumeration Tests when testing nonsterile pharmaceutical products.<sup>1</sup>

Potato Dextrose Agar can be used to grow clinically significant yeasts and molds.<sup>8,9</sup> In addition, this medium is used to stimulate sporulation (slide preparations), maintain stock cultures of certain dermatophytes and differentiate atypical varieties of dermatophytes by pigment production.<sup>10</sup>

Potato Dextrose Broth is a general-purpose broth medium for yeasts and molds (Potato Dextrose Agar without the agar).

## Principles of the Procedure

Potato starch, potato infusion and dextrose support luxuriant growth of fungi. Lowering the pH of the medium to approximately 3.5 with sterile tartaric acid achieves the inhibition of bacterial growth. It is important, however, to avoid heating the medium after it has been acidified because this action results in the hydrolysis of the agar and impairs its ability to solidify.

## Formulae

### Difco™ Potato Dextrose Agar

Approximate Formula* Per Liter	
Potato Starch (from infusion)**	4.0 g
Dextrose	20.0 g
Agar	15.0 g

\*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

\*\*Approximates 200 g of infusion from potatoes.

### Difco™ Potato Dextrose Broth

Consists of the same ingredients without the agar.

## Directions for Preparation from Dehydrated Product

- Suspend the powder in 1 L of purified water:  
Difco™ Potato Dextrose Agar – 39 g;  
Difco™ Potato Dextrose Broth – 24 g.  
Mix thoroughly.
- Heat with frequent agitation and boil for 1 minute to completely dissolve the powder.
- Autoclave at 121°C for 15 minutes.
- To alter the reaction of the agar medium to pH 3.5, cool the base to 45-50°C and aseptically add an appropriate amount of sterile 10% tartaric acid to each liter of medium. Mix well. Do not reheat the medium.
- Test samples of the finished product for performance using stable, typical control cultures.

## Sample Collection and Handling

For clinical specimens, refer to laboratory procedures for details on specimen collection and handling.<sup>8,9</sup>

For food, dairy and cosmetic samples, follow appropriate standard methods for details on sample collection and preparation according to sample type and geographic location.<sup>4,7</sup>

For pharmaceutical samples, refer to the *USP* for details on sample collection and preparation for testing of nonsterile products.<sup>1</sup>

## Procedure

For clinical specimens, refer to appropriate standard references for details on testing protocol to obtain isolated colonies from specimens using Potato Dextrose Agar.<sup>8,9</sup>

For food, dairy and cosmetic samples, refer to appropriate standard references for details on test methods using Potato Dextrose Agar.<sup>4,7</sup>

For pharmaceutical samples, refer to *USP* General Chapter <61> for details on the examination of nonsterile products and Microbial Enumeration Tests using Potato Dextrose Agar.<sup>1</sup>

### User Quality Control

NOTE: Differences in the Identity Specifications and Cultural Response testing for media offered as both **Difco™** and **BBL™** brands may reflect differences in the development and testing of media for industrial and clinical applications, per the referenced publications.

#### Identity Specifications

##### Difco™ Potato Dextrose Agar

Dehydrated Appearance: Light beige, free-flowing, homogeneous (may contain small dark particles).

Solution: 3.9% solution, soluble in purified water upon boiling. Solution is light amber, slightly opalescent.

Prepared Appearance: Light amber, slightly opalescent.

Reaction of 3.9%

Solution at 25°C: pH 5.6 ± 0.2

##### Difco™ Potato Dextrose Broth

Dehydrated Appearance: Light beige, free-flowing, homogeneous.

Solution: 2.4% solution, soluble in purified water upon boiling. Solution is very, very light amber, clear to very slightly opalescent.

Prepared Appearance: Very, very light amber, clear to very slightly opalescent.

Reaction of 2.4%

Solution at 25°C: pH 5.1 ± 0.2

#### Cultural Response

##### Difco™ Potato Dextrose Agar

Prepare the medium per label directions. Inoculate and incubate at 25-30°C for 18-48 hours (up to 7 days for *T. mentagrophytes*). For *Aspergillus brasiliensis*, incubate at 20-25°C for 5 days.

ORGANISM	ATCC™	INOCULUM CFU	RECOVERY
<i>Candida albicans</i>	10231	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	Good
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9763	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	Good
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9533	Undiluted	Good
<i>Aspergillus brasiliensis (niger)</i>	16404	<100	Growth

##### Difco™ Potato Dextrose Broth

Prepare the medium per label directions. Inoculate and incubate at 25 ± 2°C for 40-48 hours.

ORGANISM	ATCC™	INOCULUM CFU	RECOVERY
<i>Aspergillus brasiliensis (niger)</i>	16404	30-300	Good
<i>Candida albicans</i>	10231	30-300	Good
<i>Lactobacillus casei</i>	7469	30-300	Fair to good
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9763	30-300	Good

#### Identity Specifications

##### BBL™ Potato Dextrose Agar (prepared)

Appearance: Light to medium tan cream and trace hazy.

Reaction at 25°C: pH 5.6 ± 0.2

#### Cultural Response

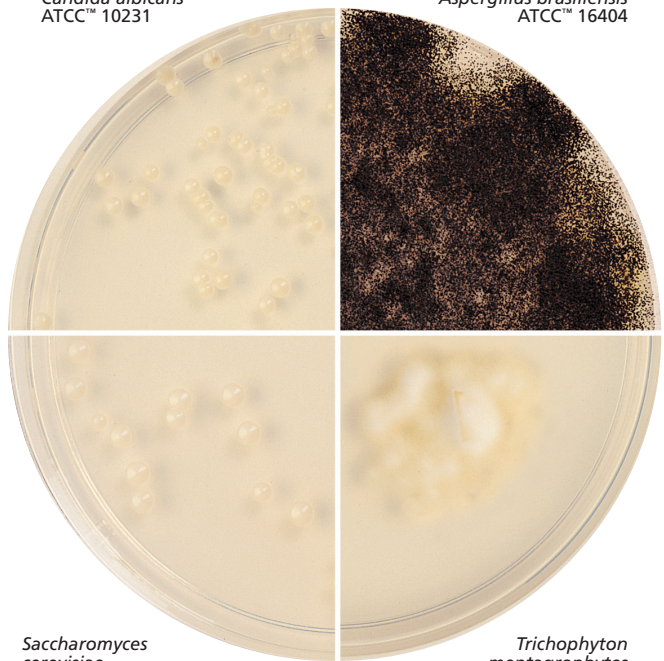
##### BBL™ Potato Dextrose Agar (prepared)

Inoculate and incubate at 20-25°C for up to 7 days (up to 3 days for *C. albicans*) under appropriate atmospheric conditions.

ORGANISM	ATCC™	INOCULUM CFU	RECOVERY
<i>Candida albicans</i>	10231	10-100	Good
<i>Candida albicans</i>	60193	10-100	Good
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9763	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	Good
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9533	Undiluted	Good
<i>Aspergillus brasiliensis (niger)</i>	16404	<100	Growth

*Candida albicans*  
ATCC™ 10231

*Aspergillus brasiliensis*  
ATCC™ 16404



*Saccharomyces cerevisiae*  
ATCC™ 9763

*Trichophyton mentagrophytes*  
ATCC™ 9533

## Vedlegg 3

Liquefy the medium in pour tubes by heating in boiling water. Cool to 45-50°C and pour into sterile Petri dishes. Allow to solidify for a minimum of 30 minutes.

Streak the specimen onto prepared media with a sterile inoculating loop to obtain isolated colonies. When used for determining yeast and mold counts, the medium should be adjusted to a pH of approximately 3.5 with sterile tartaric acid and used in the standard pour plate technique. Incubate the plates at 25-30°C with increased humidity for up to 7 days.

Tubed slants are used primarily for the cultivation and maintenance of pure cultures. They should be inoculated with an inoculating loop and incubated under the same conditions as the plated medium.

For isolation of fungi from potentially contaminated specimens, a selective medium should be inoculated along with the nonselective medium. For isolation of fungi causing systemic mycoses, two sets of media should be inoculated, with one set incubated at 25-30°C and a duplicate set at 35 ± 2°C. All cultures should be examined at least weekly for fungal growth and should be held for 4-6 weeks before being reported as negative.

Inoculation of Potato Dextrose Broth with pure cultures of yeasts can assist in their identification.

### Expected Results

After sufficient incubation, the plates which were streak inoculated should show isolated colonies in streaked areas and confluent growth in areas of heavy inoculation. The colonies in pour plates should be counted and the results expressed as yeast and mold counts per gram or milliliter of material, taking into account the applicable dilution factor.

Growth from tubes inoculated with pure cultures may be used for biochemical and/or serological testing.

For broth, observe cultures for surface growth and pellicle formation.

### Limitations of the Procedure

1. Heating Potato Dextrose Agar after acidifying hydrolyzes the agar and may destroy the solidifying properties.
2. Potato Dextrose Agar is not a differential medium. Perform microscopic examination and biochemical tests to identify isolates to genus and species if necessary.

## References

1. United States Pharmacopoeial Convention, Inc. 2008. The United States pharmacopeia 31/The national formulary 26, Supp. 1, 8-1-08, online. United States Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville, Md.
2. European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare. 2008. The European pharmacopeia, 6th ed., Supp. 1, 4-1-2008, online. European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, Council of Europe, 226 Avenue de Colmar BP907-, F-67029 Strasbourg Cedex 1, France.
3. Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare. 2006. The Japanese pharmacopeia, 15th ed., online. Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare.
4. Downes and Ito (ed.). 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
5. Horwitz (ed.). 2007. Official methods of analysis of AOAC International, 18th ed., online. AOAC International, Gaithersburg, Md.
6. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual, online. AOAC International, Gaithersburg, Md.
7. Wehr and Frank (ed.). 2004. Standard methods for the examination of dairy products, 17th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
8. Murray, Baron, Jorgensen, Landry and Pfaller (ed.). 2007. Manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Isenberg and Garcia (ed.). 2004 (update, 2007). Clinical microbiology procedures handbook, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. MacFaddin. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

## Availability

### Difco™ Potato Dextrose Agar

AOAC BAM BS12 CCAM CMPH2 COMPF EP

JP MCM9 SMD USP

Cat. No.	213300	Dehydrated – 100 g <sup>†</sup>
	213400	Dehydrated – 500 g <sup>†</sup>
	213200	Dehydrated – 2 kg <sup>†</sup>

### BBL™ Potato Dextrose Agar

AOAC BAM BS12 CCAM CMPH2 COMPF EP

JP MCM9 SMD USP

Cat. No.	221002	Prepared Pour Tubes, 20 mL – Pkg. of 10
	297241	Prepared Slants – Pkg. of 10
	299906	Prepared Bottles, 500 mL (septum screw cap) – Pkg. of 10 <sup>†</sup>

#### United States and Canada

Cat. No.	296272	Prepared Plates (Deep Fill) – Pkg. of 20*
	297945	Prepared Plates (Deep Fill) – Ctn. of 100*

#### Japan

Cat. No.	251545	Prepared Plates – Ctn. of 100*
	251821	Prepared Plates (Deep Fill) – Ctn. of 100*
	251544	Prepared Plates (150 × 15 mm-style) – Pkg. of 24*

#### Mexico

Cat. No.	252632	Prepared Bottles, 140 mL – Pkg. of 12
----------	--------	---------------------------------------

NOTE: None of the prepared media contain tartaric acid.

### Difco™ Potato Dextrose Broth

Cat. No.	254920	Dehydrated – 500 g
----------	--------	--------------------

\* Store at 2-8°C.

<sup>†</sup> QC testing performed according to USP/EP/JIP performance specifications.

## Quick-Start Protocol

---

### DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit

The DNeasy Plant Mini Kit (cat. nos. 69104 and 69106) can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 1 year.

For more information, please refer to the *DNeasy Plant Handbook*, which can be found at [www.qiagen.com/handbooks](http://www.qiagen.com/handbooks).

For technical assistance, please call toll-free 00800-22-44-6000, or find regional phone numbers at [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact).

#### Notes before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
  - If necessary, redissolve any precipitates in Buffer AP1 and Buffer AP3/E concentrates.
  - Add ethanol to Buffer AW and Buffer AP3/E concentrates.
  - Preheat a water bath or heating block to 65°C.
1. Disrupt samples ( $\leq 100$  mg wet weight or  $\leq 20$  mg lyophilized tissue) using the TissueRuptor<sup>®</sup>, the TissueLyser, or a mortar and pestle.
  2. Add 400  $\mu$ l Buffer AP1 and 4  $\mu$ l RNase A. Vortex and incubate for 10 min at 65°C. Invert the tube 2–3 times during incubation.  
**Note:** Do not mix Buffer AP1 and RNase A before use.
  3. Add 130  $\mu$ l Buffer AP2. Mix and incubate for 5 min on ice.
  4. **Recommended:** Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000 x g (14,000 rpm).
  5. Pipet the lysate into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g.
  6. Transfer the flow-through into a new tube without disturbing the pellet if present. Add 1.5 volumes of Buffer AP3/E, and mix by pipetting.

January 2011





7. Transfer 650  $\mu$ l of the mixture into a DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 1 min at  $\geq 6000 \times g$  ( $\geq 8000$  rpm). Discard the flow-through. Repeat this step with the remaining sample.
8. Place the spin column into a new 2 ml collection tube. Add 500  $\mu$ l Buffer AW, and centrifuge for 1 min at  $\geq 6000 \times g$ . Discard the flow-through.
9. Add another 500  $\mu$ l Buffer AW. Centrifuge for 2 min at 20,000  $\times g$ .  
**Note:** Remove the spin column from the collection tube carefully so that the column does not come into contact with the flow-through.
10. Transfer the spin column to a new 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube.
11. Add 100  $\mu$ l Buffer AE for elution. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C). Centrifuge for 1 min at  $\geq 6000 \times g$ .
12. Repeat step 11.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN® kit handbook or user manual.

Trademarks: QIAGEN®, DNeasy®, TissueRuptor® (QIAGEN Group). 1066957  
01/2011 © 2011 QIAGEN, all rights reserved.

