



# Översikt och identifiering av *Neonectria ditissima*, *Neofabraea* spp. och *Colletotrichum* spp. på äppelfrukt

.

*Overview and identification of Neonectria ditissima, Neofabraea spp. and Colletotrichum spp. on apple fruit*

Anna Johansson & Maja Skans

Självständigt arbete • 15 hp  
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU  
Fakulteten för landskapsarkitektur,  
trädgårds- och växtproduktionsvetenskap  
Institutionen för Biosystem och teknologi  
Trädgårdsingenjör: odling – kandidatprogram  
Alnarp 2023



# Översikt och identifiering av *Neonectria ditissima*, *Neofabraea* spp. och *Colletotrichum* spp. på äppelfrukt

*Overview and identification of Neonectria ditissima, Neofabraea spp. and Colletotrichum spp. on apple fruit*

Anna Johansson & Maja Skans

**Handledare:** Larisa Gustavsson, SLU, Institutionen för växtförädling  
**Bitr. handledare:** Jonas Skytte af Sättra, SLU, Institutionen för växtförädling  
**Examinator:** Helena Persson Hovmalm, SLU, Institutionen för växtförädling

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** G2E

**Kurstitel:** Självständigt arbete i Trädgårdsvetenskap

**Kurskod:** EX0844

**Program/utbildning:** Trädgårdssingenjör: odling – kandidatprogram

**Kursansvarig inst.:** Institutionen för Biosystem och teknologi

**Utgivningsort:** Alnarp

**Utgivningsår:** 2023

**Nyckelord:** PCR, postharvest, bitterröta, *Malus domestica*, fruktträdskräfta, kolonimorfologi,

lagringsröta, äpple

**Sveriges lantbruksuniversitet**

Fakulteten för landskapsarkitektur,  
trädgårds- och växtproduktionsvetenskap  
Institutionen för Biosystem och teknologi

## Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här: <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.

## Sammanfattning

Äppelodling upptar huvuddelen av Sveriges fruktodlingsareal, men den svenska produktionen är fortfarande liten i jämförelse med andra länder i Europa. Om Sveriges produktion ska ha möjlighet att konkurrera med andra länder måste odlingen bli mer effektiv och ett viktigt steg på vägen är att öka kunskapen om skador på äpple under lagring. Svampar kan orsaka sjukdomar vilket kan leda till stora skador i lagring och detta arbete tar upp tre av dessa: *Neonectria ditissima*, *Neofabraea* spp. och *Colletotrichum* spp.. Dessa svampar orsakar idag stora ekonomiska förluster för svenska odlare. Arbetet kombinerar en litteraturstudie med laborationer med mål att få större översikt över svamparnas sjukdomsbild samt utbredning i Sverige. Litteraturstudien berör hur tidigare diagnostisering har sett ut samt vilken utbredning svamparna har i odling och lagring. Därtill fokuserar laborationerna på identifiering och diagnostisering av svamparna genom olika metoder. Ytterligare kunskap om svamparnas utbredning och symptombild är nödvändig för att vidareutveckla förebyggande åtgärder och minska förluster. Till viss del är det möjligt att använda sig av kolonimorfologi för att artbestämma svampangrepp. Vidare, mer precis, diagnostisering är möjlig med hjälp av qPCR för *Neofabraea* spp. medan metoden måste utvecklas för att användas till diagnostisering av *Colletotrichum* spp..

Nyckelord: PCR, postharvest, bitterröta, *Malus domestica*, fruktträdskräfta, kolonimorfologi, lagringsröta, äpple

## Abstract

Apple orchards are the main part of the fruit-growing orchards in Sweden, but Swedish production is still small compared to other European countries. If Swedish production is supposed to be able to compete with other countries, the cultivation must be more efficient and a step towards that is a bigger knowledge about storage injuries on apples. Fungal diseases can cause big losses during storage and this report mentions three fungi: *Neonectria ditissima*, *Neofabraea* spp., and *Colletotrichum* spp.. These fungi cause big economical losses for Swedish growers. This report combines a literature study and laborations with the goal of getting a bigger overview of the disease and distribution of fungi in Sweden. The literature study refers to how previous diagnosis has been made and the spread of fungi in cultivation and storage. In addition, the laboratories focus on the identification and diagnosis of fungi through different methods. Additional knowledge of the fungi distribution and symptoms is necessary to further develop preventive measures and reduce losses. It is possible to use colonial morphology to identify fungi to some extent. Further, more precise, diagnosis is possible by qPCR for *Neofabraea* spp. while the method needs further development to function for the diagnosis of *Colletotrichum* spp..

Keywords: PCR, postharvest, bitterrot, *Malus domestica*, cankers, colonial morphology, storage rot, apple

## Förord

Tack till Jorunn Børve (NIBIO, Norge) och Tuuli Haikonen (LUKE, Finland) för isolat av *Neofabraea* spp. och *Colletotrichum* spp. som användes som kontroller i studien. Tack till Oksana Korniienko och Marina Kuzmenkova för utmärkt teknisk handledning och förarbete. Detta projekt var möjligt tack vare ekonomiska medel från Partnerskap Alnarp (projekt 1409/Trg/2022 och 1410/Trg/2022) och samarbete med Äppelriket Österlen Ek. För.

Och ett stort tack till Larisa Gustavsson och Jonas Skytte af Sättra för superb handledning och engagemang!

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Inledning</b>   | <b>8</b>  |
| Bakgrund   | 8         |
| <i>Neonectria ditissima</i>  | 9         |
| <i>Neofabraea</i> spp.   | 9         |
| <i>Colletotrichum</i> spp.   | 9         |
| Förluster i lagring  | 10        |
| Sjukdomsdiagnostik   | 10        |
| PCR  | 11        |
| <b>Avgränsningar</b>   | <b>12</b> |
| <b>Syfte &amp; Frågeställning</b>                                    | <b>13</b> |
| <b>Material &amp; Metod</b>  | <b>14</b> |
| Insamling av prover  | 14        |
| Isolering av svampar   | 14        |
| Kolonimorfologi  | 14        |
| qPCR analys  | 15        |
| Elektrofores på agarosgel av qPCR-testade <i>Colletotrichum</i> spp. | 15        |
| <b>Resultat &amp; Diskussion</b>                                     | <b>17</b> |
| Kolonimorfologi  | 17        |
| qPCR analys  | 19        |
| Gelelektrofores  | 20        |
| DNA-identifikation   | 21        |
| Mottaglighet hos olika äppelsorter                                   | 22        |
| Förebyggande åtgärder och bekämpning                                 | 22        |
| Lagring och postharvest  | 22        |
| Klimatförändringarnas påverkan                                       | 23        |
| Svamppatogener i olika delar av världen                              | 23        |
| <b>Slutsats</b>  | <b>25</b> |
| <b>Källhänvisning</b>  | <b>26</b> |

## Inledning

Äpple utgör ett av de största segmenten inom produktion av frukt och grönt i Sverige. Enligt insamlad data utgjorde äppelodlingen mellan 2002 och 2022 den tredje största odlingsarealen för frilandsgrodor i Sverige, med cirka 85% av den totala arealen för fruktodling i Sverige (Jordbruksverket 2022). Utifrån perioden i samma rapport har skörden av äpple ökat från 18 500 ton till 31 500 ton. Denna ökning är inte enbart en följd av en ökad satsning på äppelodling utan även ett resultat av mer kunskap bland odlare som leder till bättre skördar. Trots den relativt stora omfattningen av äppelodling i landet utgjorde den svenska äppelproduktionen endast 0,2% av EUs (inkl. Storbritannien) totala produktion av äpple 2022 (European Commission, Agriculture, and rural development 2023). För att svensk äppelodling ska vara produktiv och effektiv, är det viktigt med fortsatt växande kunskap om sjukdomar och problem som kan påverka äppelodling samt efterskördshanteringen av äpple negativt, detta på grund av bristande kunskap som kan leda till stora skördeförluster och som följd ekonomiska förluster för odlare.

### Bakgrund

Detta arbete bygger på och utökar pågående studier vars syfte är att uppskatta i vilken utsträckning *Neonectria ditissima* orsakar lagringsröta, samt om det kan vara korrelerat med förekomst av fruktträdskräfta i odlingarna. I det pågående projektet undersöks äppelfrukt med symtom som kan potentiellt vara orsakade av fruktträdskräfta (Skytte af Sätra, personligt meddelande). Under inspektion av kolonimorfologi, bekräftat med molekylär identifiering, tyder preliminära resultat på att en relativt stor andel av lagringsrötan kring fruktflugan och skaftet orsakas av andra svampar än *Neonectria ditissima*, med *Neofabraea* spp. och *Colletotrichum* spp. som troliga kandidater utifrån tillgänglig litteratur. Samtliga delar av laborationsmaterialet, såväl frukt som dna-prover, i denna studie kommer från det ovan nämnda projektet.

Fokuset för detta arbete omfattar därför tre olika svampar (*Neonectria ditissima*, *Neofabraea* spp. och *Colletotrichum* spp.) vilka idag skapar stora skador på äpplen i odlingar och under lagring. *N. ditissima* är en av de svampar som orsakar störst förluster i svensk fruktodling medan *Neofabraea* spp. och *Colletotrichum* spp. anses vara de två främsta patogenerna som orsakar lagringsskador hos äpplen (Tahir 2014a).



### ***Neonectria ditissima***

*Neonectria ditissima* är en svamp som lever på lövträd, dess värdträd är bland annat bok (*Fagus sylvatica*), asp (*Populus tremula*) och äppelträd (*Malus domestica*). Sjukdomen som svampen orsakar kallas lövträdskräfta eller fruktträdskräfta beroende på värdväxt (Åkesson & Boysen 2005). *N. ditissima* angriper oftast unga träd dock kan symptom av sjukdomen uppkomma först flera år senare i form av kräftsvulster som orsakar stora skador på värdträdet. Det vanligaste sättet att bekämpa svampen i odling är att skära bort kräftangrepp och ta hand om sår som uppstår (Tahir 2014a). Okontrollerad kräfta kan leda till att det angripna trädet behöver avlägsnas från odlingen (Weber 2014). Frukt som vuxit på angripna äppelträd kan smittas och är olika mottagliga för smitta beroende på vilken mognadsgrad frukten befinner sig i (Xu & Robinson 2010). Stora skördeförstär följder som resultat av smittade frukter i odlingen. Svampen skapar även stora problem med röta efter skörd, lagringsrötan anses visa sig som ögonröta vid äpplets fruktfluga och skaft och symptom uppkommer först efter en längre tid i lagring.

### ***Neofabraea* spp.**

Det finns fyra stycken arter av *Neofabraea* spp. som orsakar röta hos äpplen, *Neofabraea alba*, *Neofabraea kienholzii*, *Neofabraea malicorticis* samt *Neofabraea perennans* (de Jong et al. 2001; Spotts et al. 2009). *Neofabraea* spp. kan orsaka nekros på äppelträdens bark men huvudsakligen uppstår problem vid lagring av frukten (Aguilar et al. 2019). Frukten infekteras oftast genom porerna på skalet, som kallas lenticeller, under odlingen men symptom uppstår först efter skörd. I lagring tar det några månader för symptom att visa sig på frukten (Jordbruksverket 2014). Symptomen uppkommer som olika sorters röta beroende på vilken art av *Neofabraea* som angripit frukten. Vanligtvis orsakar *Neofabraea* spp. röta på äpplets sidor men det går även att se röta vid fruktflugan eller kring skaftet.

### ***Colletotrichum* spp.**

*Colletotrichum* spp. är en kosmopolitisk svamp som skapar stora skador på äppelodlingar över hela världen. Symptomen vid angrepp kan uppstå från sensommar till och med efter skörd. Svampen orsakar sjukdomen bitterröta på mogen frukt med symptom som visar sig genom runda, brunfärgade skador på skalet och en v-formad röta in mot kärnhuset. Ofta uppstår symptom först under lagring (Oo et al. 2018). *Colletotrichum* spp. kan också angripa bladen och orsakar då sjukdomen Glomerella leaf spot (González et al. 2006).

## Förluster i lagring

För att minska och förebygga förluster som orsakas av dessa sjukdomar under lagring, behöver man ha kunskap om dess utbredning i Sverige. För närvarande finns det i princip ingen dokumenterad information om omfattningen av skador orsakade av *N. ditissima*. De pågående studierna har dock påbörjat en kartläggning av utbredningen av *N. ditissima* i svensk äppelodling (Lantbruksnytt 2023). Det finns tidigare information om lagringsförluster som följd av fysiologiska skador och lagringssjukdomar orsakade av andra svampar, inklusive *Neofabraea* spp. och *Colletotrichum* spp. (Tahir 2014a). Förlusterna under lagring var större hos äpplen odlade i ekologisk odling än på frukt från odlingar som tillämpar Integrerad produktion (IP). De största förlusterna utgjordes av skador orsakade av svampangrepp, främst *Neofabraea* spp. och *Colletotrichum* spp.. Möjligheterna för behandling med fungicider mot *Neofabraea* spp. och *Colletotrichum* spp. både under pre- och postharvest har testats och forskats på i flertalet länder för att kontrollera patogenernas utbredning i odlingar (Aguilar et al. 2017; Abbott & Beckerman 2018). Oberoende av forskningens resultat går det inte att tillämpa direkt på svensk odling då användandet av fungicider efter skörd inte är tillåtet enligt svensk lag i dagsläget. Det krävs istället ökad kunskap om svamppatogener och förebyggande metoder samt behandling av eventuella angrepp för att minska förluster dessa orsakar. För att kunna anpassa och optimera det förebyggande arbetet mot angrepp så är en korrekt sjukdomsdiagnos mycket viktig.

## Sjukdomsdiagnostik

Första steget i diagnostisering är att undersöka och identifiera symptom ute i odlingen, både på frukten och på trädet. Denna metod är svår att utföra om symptomen uppkommer under efterskördshanteringen, då det inte går att säga vilket träd som det angripna äpplet kommer från. Symptom av *N. ditissima* och *Neofabraea* spp. uppkommer oftare i odlingen än symptom av *Colletotrichum* spp. som främst visar sig som lagringsröta (Åkesson & Boysen 2005; Aguilar et al. 2019; González et al. 2006). Det kan däremot vara svårt att förlita sig på diagnostiken i fält då symptomen som olika svampar orsakar både på frukt och träd kan vara väldigt lika varandra, särskilt om symptomen orsakas av olika arter av samma patogensläkte. Det är viktigt att göra en mer djupgående undersökning för identifiering av svamppatogenen för att kunna motverka ett mer omfattande svampangrepp, därför kan ofta vidare undersökning av de angripna frukterna ge värdefull information för att planera vidare odlingstekniska åtgärder.

För vidare identifiering är kolonimorfologi en vanlig metod som används för undersökning av svampen. Metoden bygger på att få en utväxt av svampen på ett visst *in vitro* medium vilket leder till en uppförökad koloni som är möjlig att

undersöka visuellt, då olika svampar kan ge uttryck för artkaraktäristiska former, spridningar och färger av kolonin. Beroende på agarmediet som används kan svamparna ge olika uttryck i tillväxt och färg och många egenskaper överlappar mellan arterna. Med optimal temperatur samt näringstillgång i mediet induceras snabb sporulering av konidier och andra strukturer som till exempel appressoria, ett organ som svampen bildar för att attackera värdväxten, vilket möjliggör undersökning av spormorfologin i mikroskop för närmare identifiering (Cameldi et al. 2017). Koloni- och spormorfologi kan ge en korrekt identifiering av svamppatogener på relevant taxonomisk nivå, men kompletterande tester som baseras på användning av polymerase chain reaction (PCR) (Vico et al. 2016; Oo et al. 2018) kan användas för korrekt, och i vissa fall snabbare, identifiering.

## **PCR**

Då vissa svamppatogener ger näst intill identiska symptom på äpplen kan identifiering av dessa patogener vara svårt genom enbart analyser av svampens morfologi. PCR används för att med hjälp av primers designade för specifika genomregioner, amplifiera dessa och därefter detektera antingen via gelelektrofores eller kvantitativ PCR (engelska 'quantitative PCR', förkortning qPCR). I detta arbete används i första hand qPCR, som visar amplifieringen i realtid vilket är användbart för att kunna se vid vilken cykel som amplifieringen passerar tröskeln för signifikans, till skillnad från konventionellt PCR-test då endast slutresultatet visas. För att bekräfta en specifik amplifiering kan en smältkurva genereras från qPCR, denna bör då överensstämma med en kurva från ett referensprov. Alternativt kan gelelektrofores användas för att visualisera resultat av qPCR och konventionell PCR. Man verifierar då korrekt amplifiering genom att jämföra fragmentens fysiska storlek med en serie storleksmarkörer som används tillsammans med proverna. Beroende på designen på primer-paret kan de amplifierade fragmentens längd vara specifika för olika arter, och således användas för att fastställa vilken art som ligger bakom symptomen på till exempel frukt.

## Avgränsningar

En del avgränsningar har valts vid utförandet av detta arbete. Arbetet omfattar endast tre svampar: *N. ditissima*, *Colletotrichum* spp. och *Neofabraea* spp., men det finns även andra patogener som kan orsaka röta på äpplen.

Proverna som användes i projektet kommer från Äppelrikets odlingar i södra Sverige och resultaten kan därför inte spegla svamparnas utbredning i hela Sverige.

På grund av begränsad tid har endast 35 äpplen kunnat läggas ut för undersökning av kolonimorfologi. Tidsbegränsningen ledde även till att det inte gick att testa de positiva *Neofabraea* spp.-svaren från qPCR-analysen med gelelektrofores för möjlig vidare artbestämning.

## Syfte & Frågeställning

Syftet med arbetet är att göra en fördjupad undersökning om diagnostisering av tre svammpatogener, *N. ditissima*, *Neofabraea* spp. och *Colletotrichum* spp.. Ökad kunskap om möjligheter till snabb och effektiv sjukdomsdiagnostisering och patogenernas utbredning kan användas för att underlätta utveckling av framtida bekämpningsstrategier.

I detta arbete presenteras en litteraturstudie som kompletteras med laboratorieundersökningar vars syfte är att ge ökad förståelse för i vilken omfattning de ovan nämnda svammpatogenerna orsakar röta på äpplen i lagring hos odlare i Skåne.

Arbetet har syftat till att besvara följande frågeställningar:

Kan infektion av *Neonectria ditissima* identifieras i lenticellrötor?

Är publicerade PCR protokoll för *Neofabraea* spp. och *Colletotrichum* spp.

lämpliga att använda för effektiv identifiering utan vidare metodutveckling? Om så är fallet, är det möjligt att bekräfta att några av de kulturer som i tidigare studie (Skytte af Sätra, pers. meddelande) bekräftat inte är *N. ditissima* istället skulle kunna vara *Neofabraea* spp. eller *Colletotrichum* spp.?

## Material & Metod

### Insamling av prover

35 frukter av sorten 'Frida', med olika symptom av röta placerad på sidan av äpplena samt runt skaft och fruktfluga och som inte antogs tillhöra *Neonectria ditissima* valdes ut för analyserna. Äpplena tillhörde det tidigare nämnda projektet och var levererade från Äppelrikets lagringslokaler. Frukten förvarades enligt standard för Äppelriket innan leverans till Alnarp där de sedan förvarades 7 dagar i kylrum (4°C) inför laborering.

### Isolering av svampar

I korthet lades prover av fruktkött från gränssnittet mellan sjuk och frisk vävnad aseptiskt på vattenagar. Äpplena ytdesinficerades med 70% etanol (EtOH) och skalet vid det angripna området togs bort med en skalpell. En liten bit av fruktköttet (ca 10×10×6 mm) avlägsnades sedan från rötans ytterkant, där spridningen av svampangreppet antogs vara främst av den primära svampen som skulle undersökas. Den avlägsnade biten av äpplet desinfekterades i 70% EtOH ytterligare ett par sekunder innan den lades på vattenagar i en Petriskål. Redskap och instrument desinfekterades med 70% EtOH mellan insamling av varje prov för att undvika kontaminering. Odlingen av svamparna gjordes först på 1.5 % vattenagar, ett näringsfattigt medium för att minska risken för mer snabbväxande sekundära svampar (såsom *Botrytis* spp. och *Penicillium* spp.) att föröka sig först. Petriskålarna förslöts med parafilm och förvarades i rumstemperatur på laboratoriebänk i 7 dagar.

### Kolonimorfologi

En bit vattenagar med mycel förflyttades från de 7 dagar gamla kulturerna och fördes över på petriskålar förberedda med potatis dextros agar (PDA) media, för att inducera karakteristisk tillväxt av svampkolonin. Överföringen utfördes i sterilbänk och redskapen steriliserades i en kulsterilisator (250°C) mellan proverna för att undvika kontaminering. Petriskålarna förslöts med parafilm och kolonierna fick växa 9 dagar i rumstemperatur på en laboratoriebänk innan avläsning.

Kolonierna grupperades efter liknande morfologi, baserat på tillväxt, färg och textur. Ett urval av prover vars morfologi på PDA liknade *Neonectria ditissima*, *Neofabraea* spp. och *Colletotrichum* spp. valdes ut och det motsvarande 16 dagar gamla provet på vattenagar undersöktes med inverterat mikroskop för formation av appressoria och/eller konidier.

## qPCR analys

DNA:t som används i denna analys hade extraherats från kulturer som isolerats och odlats under tidigare nämnda projekt. qPCR analysen utfördes med tidigare publicerade primers som utvecklats för att specifikt detektera arterna *Neofabraea alba* (Neo\_alba3) och *Neofabraea perennans* (Neo\_per-loTub-382) samt den kompletterande universala primern, Neofab\_uni (Michalecka et al. 2016b). För detektion av *Colletotrichum* spp. användes primerparet GDF1/C-GAPDH-R från Hu et al. (2015) (Tabell 1). qPCR reaktionerna utfördes i en volym på 20 µl per prov, där 10 µl var SsoFast EvaGreen Supermix (1725200, Bio-Rad Laboratories AB), 0,8 µl universal primer för *Neofabraea*, 0,2 µl av respektive artspecifik primer och 8,8 µl DNA (~3ng/µl), alternativt 1,2 µl av respektive primer för *Colletotrichum* och 7,6 µl DNA (~3ng/µl). Plattan var sammansatt av totalt 50 prov, där 21 prov testades för *Neofabraea* spp. och samma 21 prov testades för *Colletotrichum* spp., två referensprov för *Neofabraea* spp. (FU5, positiv kontroll) och två referensprov för *Colletotrichum* spp. (FU1, positiv kontroll) samt två prov av standardisolat av *Neonectria ditissima* (SLU-E1, negativ kontroll) och två prov av TE-buffert (negativ kontroll). Amplifikationen inleddes med 94°C denaturation i 3 minuter följt av 35 cykler bestående av 40 sekunders denaturation i 94°C, annealing i 40 sekunder i 57°C samt elongering i 60 sekunder i 72°C och ett avslutande steg med elongering i 5 minuter i 72 °C. Programmet avslutades med en smältkurva.

Tabell 1: Lista över primers använda i studien samt deras nukleotidsekvenser

| Primernamn        | Primersekvens (5' - 3')   | Orientation | Referens                  |
|-------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|
| Neo_per-loTub-382 | GGGTCGAACATCTGTTGT        | Reverse     | Gariépy et al. (2003)     |
| Neo_alba3         | AATATTAGCAGGATATCTCTTCAAG | Reverse     | Michalecka et al. (2016b) |
| Neofab_uni        | AACTTTCTCCGTTGTCCCATC     | Forward     | Michalecka et al. (2016b) |
| GDF1              | ATGGCTCCCATCAAGGTCG       | Forward     | Hu et al. (2015)          |
| C-GAPDH-R         | TACTTGAGCATGTAGGCCTG      | Reverse     | Hu et al. (2015)          |

## Elektrofores på agarogel av qPCR-testade *Colletotrichum* spp.

*Colletotrichum* spp. amplifieringsprodukt av qPCR visualiserades även på gelelektrofores. Sammanlagt 25 prover (21 testprover plus 4 kontroller) förbereddes genom att 4 µl av vardera PCR-produkt blandades med 4 µl Milli-Q vatten (MQ) och 2 µl 6X Orange DNA Loading Dye (ThermoFisher Scientific). 10 µl av blandningen och 3 µl av storleksmarkörer, O'RangeRuler 50bp DNA

ladder, ready-to-use (ThermoFisher Scientific) kördes på en 2% agarosgel innehållande SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories AB). Elektrofores utfördes vid 100 V under 45 min. Efter elektroforesen fotograferades gelen i en ultraviolet (UV) kammare för att möjliggöra avläsning av resultaten.



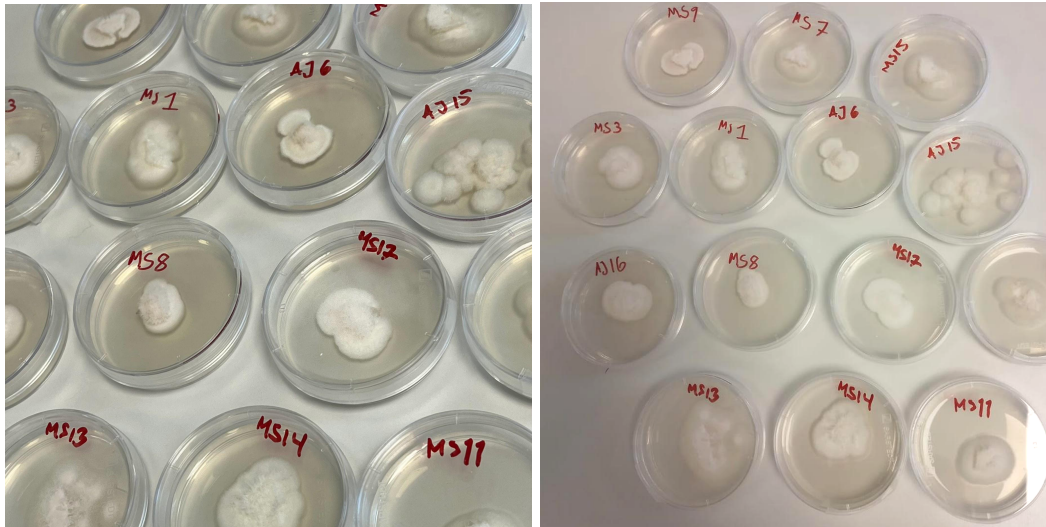
## Resultat & Diskussion

### Kolonimorfologi

Proverna på PDA undersöktes enligt följande egenskaper: tillväxt, färg, textur och andra utmärkande drag. Kolonierna delades sedan in i grupper baserat på vilken svamp morfologin matchade enligt tidigare forskning. Kolonier av *Neonectria ditissima* odlade på PDA beskrivs som vita till beiga med gula inslag (Gelain et al. 2021). En grupp med *Neofabraea* spp. delades in efter krämfärgade till rosa kolonier med ull-lik textur efter beskrivning av Vico et al. (2016). Det finns många olika uttryck av *Colletotrichum* spp. beroende på art. För att identifiera kolonin utgick vi från Khodadadi et al. (2020) där kolonier av olika arter *Colletotrichum* spp. beskrivs med varierande färgsättning och storlek. En del av proverna kunde uteslutas då de inte passade in på beskrivningen (elva stycken) på någon av svamparnas kolonier, därtill ansågs åtta stycken av proverna ha blivit kontaminerade. Två stycken prover kunde även uteslutas från att tillhöra någon av *N. ditissima*, *Neofabraea* spp. och *Colletotrichum* spp. då dessa ansågs tillhöra *Penicillium* spp..

Skytte af Sättra har i sin pågående studie endast utgått från att *N. ditissima* angriper äpplen via fruktfluga och stjälk. Till vårt arbete togs en viss batch ut med äpplen med lenticellröta för bedömning då Weber (2014) skrev att svampen även kunde ge uttryck för röta på andra delar av äpplet efter skörd. Enligt bedömning av kolonimorfologin gick det inte att identifiera någon *N. ditissima* bland proverna av denna batchen, således kan inte vårt resultat stötta Webers (2014) påstående om att *N. ditissima* även kan orsaka lenticellröta på äpplen i lagring.

I vår batch antogs 14 av 35 prov tillhöra *Neofabraea* spp. baserat på dess kolonimorfologi. Proven visade vita till krämfärgade, ull-lik kolonier med relativt långsam tillväxt (se Fig. 1). Det gick inte att fastställa vilken art av *Neofabraea* spp. som kolonierna tillhörde då arternas morfologiska uttryck skiljer sig för lite från varandra för att möjliggöra artidentifiering. Olika arter av *Neofabraea* spp. kan ge olika uttryck i kolonifärg- och form beroende på agar som används samt hur länge kolonin legat på mediet. Kolonimorfologi är effektivt för provisorisk identifiering av *Neofabraea* spp. i symptomatisk frukt, men för säker bestämning och vidare identifiering av art krävs undersökning av konidiomorfologi, PCR-baserat test med gelseparation för att fastställa längd på amplifierad produkt, eller sekvensering.



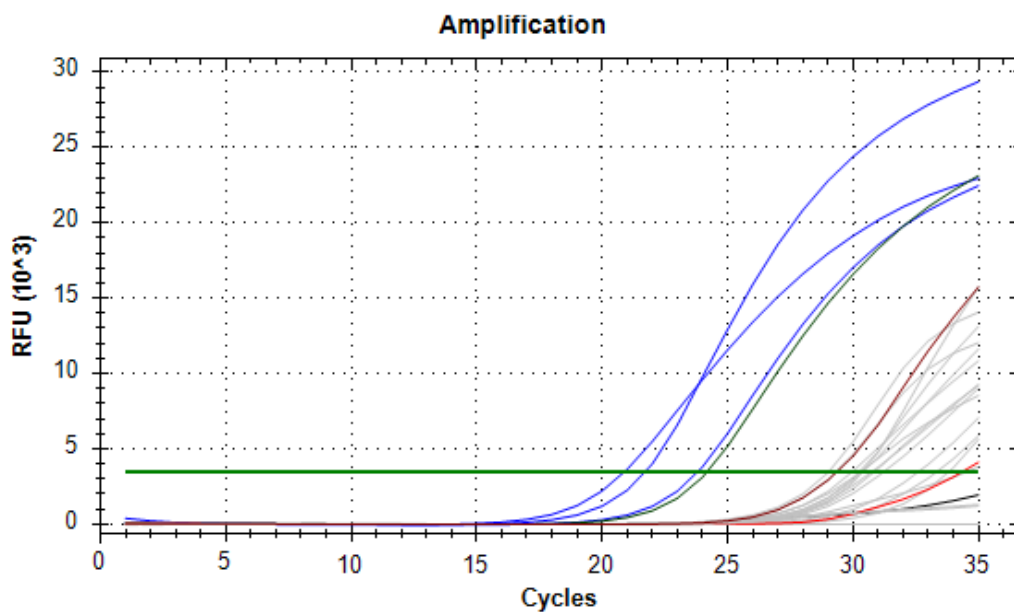
Figur 1: Kolonier med morfologi typisk för *Neofabraea* spp. på PDA.

Någon identifikation av *Colletotrichum* spp. kunde inte göras av våra prover. På olika arter inom *C. gloresporidium*- och *C. atucatum*- komplexen var koloniernas morfologiska uttryck på PDA gula, vita och gråa mycel (Oo et al. 2018). Enligt Khodadadi et al. (2020) så kunde de se att kolonin från *C. fiorinae* som är en del av *C. acutatum*-komplexet hade en tydligt rosa färg när det odlades på PDA. Svamparna kan växa olika snabbt beroende på vilken art av *Colletotrichum* det är (Weir et al. 2012). Då *Colletotrichum* spp. har identifierats genom kolonimorfologi i tidigare studier tyder våra resultat på att det inte fanns någon smitta av *Colletotrichum* spp. i vår batch.

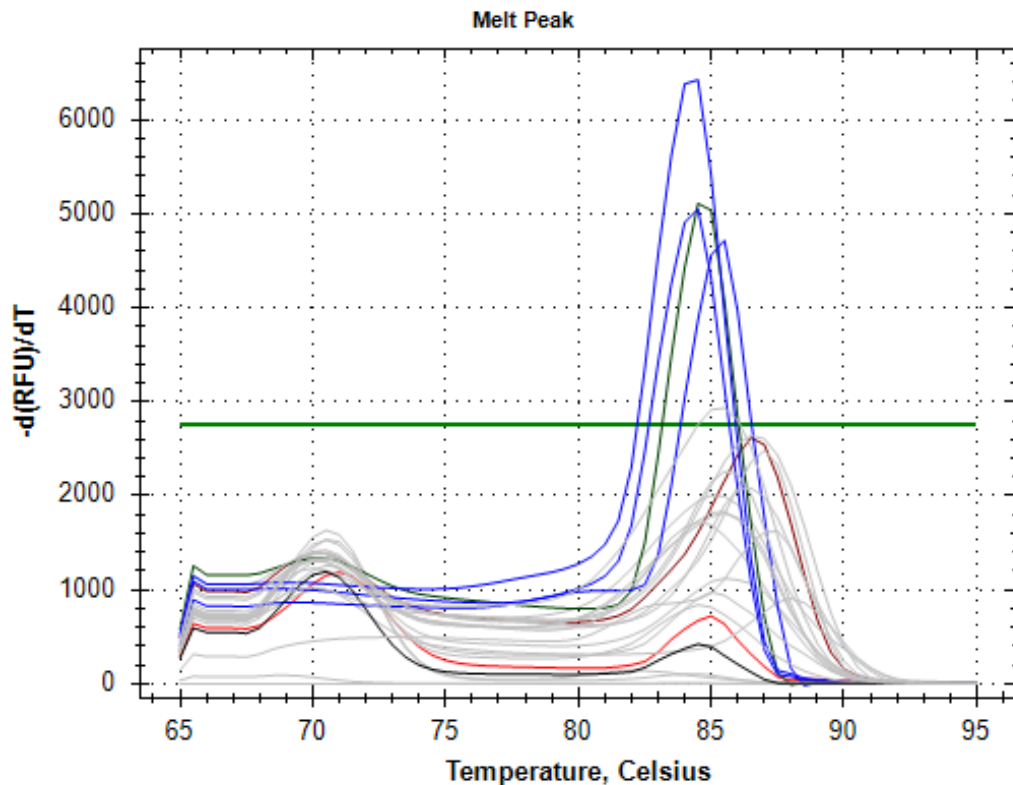
Eftersom våra kolonier endast växte under 16 dagar på vattenagar innan observation i inverterat mikroskop, kunde vi inte se några utvecklade konidier av de tre svampar som var föremål för studien. Däremot kunde sporulerande strukturer typiska för *Penicillium* spp. ses på prover från frukt som uppvisade symptom typiska för infektion av *Penicillium* spp.. Konidier utvecklas vanligen på PDA eller annat näringsrikt medie efter 10 till 14 dagar, beroende på svampart (Oo et al. 2018; Cameldi et al. 2017). Synliga konidier skulle kunna användas för vidare identifiering av kolonierna då olika svampars konidier har artspecifika egenskaper (Chaverri et al. 2011; Chen 2016; Oo et al. 2018). Prover på vattenagar går att undersöka i mikroskop utan att avlägsna dem från petriskålen. Prover på PDA behöver däremot flyttas över till objektglas då PDA inte är tillräckligt genomskinligt för direkt observation i mikroskop, vi valde därför att endast undersöka kolonierna på vattenagar.

## qPCR analys

qPCR analysen kördes i 35 cykler för att kunna genomföra *Colletotrichum*-reaktionen på samma platta som *Neofabraea*-reaktionen, som annars behöver endast 30 cykler. Analysen visade tre positiva prover av *Neofabraea* spp. då dessa liksom referensprovet amplifierades före cykel 30 (Fig. 2). Olika DNA-sekvenser har olika smältpunkter beroende på sekvensens uppbyggnad av nukleotider samt sekvensens längd. Smältpunktsanalysen visar tydligt att de tre positiva proven samt referensprovet för *Neofabraea* spp. har liknande smältpunkt som tyder på att det finns *Neofabraea* spp. i äppelproven. Gällande primer-paret för *Colletotrichum* spp. resulterade alla prov utom tre (TE-buffert och två prov för analys) i amplifiering (Fig. 3). Ingen tydlig smältpunkt som överensstämde mellan kontrollprovet och något av de analyserade proven kunde identifieras. Alltså verkar detta protokoll inte vara lämpligt för identifiering av *Colletotrichum* spp. med qPCR utan vidare metodutveckling.



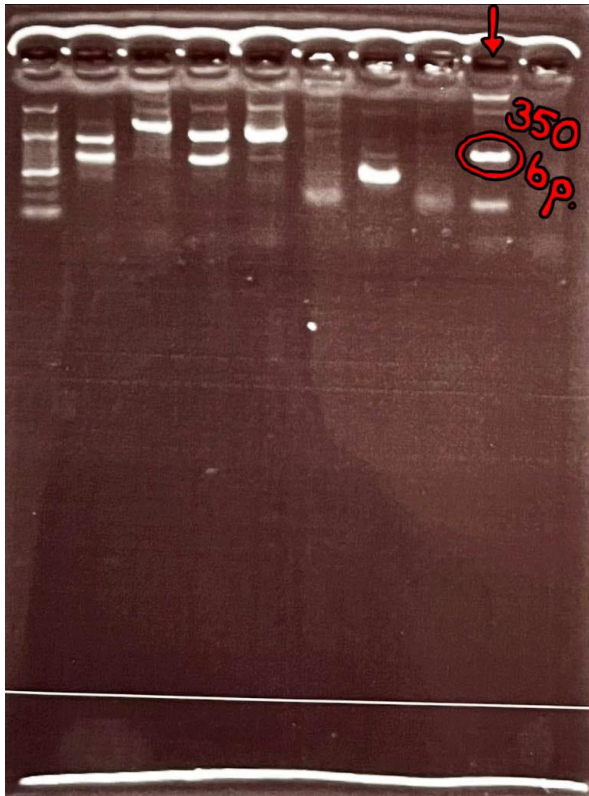
Figur 2: Resultat av qPCR analys som kan användas för detektion av *Neofabraea* spp. RFU/Relative Fluorescence Unit på y-axeln är en måttenhet som detekterar fluorescens. Färgmarkering av *Neofabraea* spp.-kontroll (grönt), NTC/No Template Control - kontrollprov utan template-DNA som visar ifall det skett någon kontaminering (svart), tröskelnivå/threshold level (ljusgrön horisontell linje), SLU-E1 (mörkrött), *Colletotrichum* spp.-kontroll (ljusrött), tre positiva prover för *Neofabraea* spp. (blå) och resterande 38 prov som inte var positiva för varken *Neofabraea* spp. eller *Colletotrichum* spp. (ljusgrå).



Figur 3: Smältpunktsanalys som visar att *Neofabraea* spp.-kontroll och de tre positiva proven har liknande smältpunkt. Y-axeln visar den negativa derivatan av RFU i relation till tröskelnivån,  $-d(\text{RFU})/dt$ . Färgmarkering av *Neofabraea* spp.-kontroll (grönt), NTC/No Template Control - kontrollprov utan template-DNA som visar ifall det skett någon kontaminering (svart), tröskelnivå/threshold level (ljusgrön horisontell linje), SLU-E1 (mörkrött), *Colletotrichum* spp.-kontroll (ljusrött), tre positiva prover för *Neofabraea* spp. (blå) och resterande 38 prov som inte var positiva för varken *Neofabraea* spp. eller *Colletotrichum* spp. (ljusgrå). Notera att flera av de negativa proven har en peak vid 70°C som förmodligen är primer-dimers.

### Gelelektrofores

Eftersom qPCR analysen inte gav något entydigt svar om *Colletotrichum* spp., valde vi att även genomföra en gelelektrofores på samtliga prover amplifierade med *Colletotrichum* spp. i PCR reaktionen. Kontrollprovet visade ett fragment av avsedd längd på 350 baspar (bp), men inga av de andra proven visade entydiga fragment av avsedd längd. Några prov uppvisade fragment på 350 bp men endast tillsammans med andra fragment av så kallade dubbelband och stämde således inte helt överens med referensprovet. Gelelektroforesen kunde alltså inte heller bekräfta förekomst av *Colletotrichum* spp. i något av proven (Fig. 4).



Figur 4: Bild av gelelektrofores i UV-kammare. Brunnen vid röda pilen är referensprovet för *Colletotrichum* spp. med amplifierad produkt på ca 350 bp. Första brunnen från vänster är storleksmarkörerna.

### DNA-identifikation

PCR-identifikation av svamp har används i tidigare studier för att separera och härleda angrepp till specifika svamppatogener i syfte att möjliggöra anpassad bekämpning eller för att kvantifiera svampangrepp i odlingar och vid efterskördshantering (Tahir 2014b; Henriquez et al. 2004; Ferrer et al. 2001). För att vidareutveckla denna metod måste det göras fler studier på vilken identifieringstest som passar vilken svamp bäst. Carneiro et al. (2022) beskrev rötan som uppstår på äpplen angripna av *N. alba* och *N. kienholzii* som oskiljaktiga utan DNA-identifiering och molekylära fylogenetiska analyser. Försök till identifiering via mikroskopiundersökning av svampens konidier är otillräckligt då sporer mellan arterna kan vara lika varandra. Först under senare år när PCR har börjat användas för säker identifiering kunde svamparnas genetiska relationer börja kartläggas. Det finns många olika arter av *Colletotrichum* spp., enligt en sammanställning av Jayawardena et al. (2016) fanns det 190 olika arter uppdelat på 11 komplex år 2016. Då det finns många arter i komplexet, med liknande symptombild blir identifiering (morfologisk eller molekylär) komplicerad, vilket försvårar utvecklingen av effektiva identifieringsmetoder.

### **Mottaglighet hos olika äppelsorter**

Olika äppelsorter skiljer sig i sin mottaglighet för svampangrepp och äppelsorterna kan också vara mer eller mindre mottagliga för olika svamparter. Av angrepp av *Neofabraea alba* och *Neofabraea kienholzii* tillhörde 84% av de angripna äpplena 5 äpplesorter: 'Golden Delicious', 'Roho 3615/Evelina', 'Pinova', 'Cripps Pink/Rosy Glow' och 'Braeburn' (Carneiro et al. 2022).

Enligt en studie på drabbade äpplen i Tyrolen så gick det att se att 'Roho 3615/Evelina' även var mest mottaglig för att utveckla sjukdomen bitterröta, orsakad av *Colletotrichum* spp., medan 'Golden Delicious' hade en högre motståndskraft mot sjukdomen (Carneiro & Baric 2021), i den studien var också nästan alla smittade äpplen ekologiskt odlade.

### **Förebyggande åtgärder och bekämpning**

Fruktträdskräfta orsakad av *N. ditissima* visar sig genom svulster på stammen och grenarna. Svampen tar sig in genom skador på barken, så som skador efter beskärning eller andra sår. Detta gör att det är viktigt att beskära vid rätt tidpunkt samt att arbeta med behandling av uppkomna sår (Tahir 2014a).

Ett sätt att minska risken för angrepp är att använda sig av fungicider mot svamparna. En studie i USA (Martin et al. 2022) undersökte om *Colletotrichum* spp. hade fått en högre resistens mot single-site mode of action (single MoA) fungicider efter att fler rapporter om skador inkommit. Single MoA är en sorts fungicid utvecklad för att angripa en specifik biosyntetisk process. Detta gör att resistens enklare kan utvecklas mot den sortens fungicider men baserat på studiens data gick det inte att visa att det fanns en högre resistens mot de fungicider som de testade. Abbott och Beckerman (2018) visade på stora skillnader i effekt på svampen mellan olika testade fungicider. Captan i kombination med andra fungicider som Li700 samt Bond Max kunde skydda trädet och frukten bättre än Captan som ensam fungicid. Bekämpning med fungicider efter skörd har visat positiva resultat (Aguilar et al. 2017) men då det är förbjudet med fungicider på frukt i lagring i Sverige krävs det förebyggande åtgärder i fält för att minska svampangreppen. För att optimera användandet av fungicider i odlingarna är det viktigt att fortsätta forskning på detta ämne.

### **Lagring och postharvest**

För att undvika förluster i lagring är det viktigt att optimera lagringsförhållanden och efterskördbehandlingen. Det går även att behandla äpplen med varmt vatten efter skörd, vilket kan minska utbrott av lenticellröta orsakad av *Neofabraea alba* under lagring (Neri et al. 2009). Enligt Tahir (2006) så minskar rötan i lagring

orsakad av *Colletotrichum* spp. vid värmebehandling tillsammans med lagring i ULO-lager (lager med låg syrenivå och hög koldioxidnivå) i jämförelse med vanlig kylagring. För odlare är det viktigt att veta vilken lagring och hantering som passar frukten bäst eftersom att lagringsinvesteringar med ny teknologi ofta är en stor utgift, därför måste odlarna veta att det är ekonomiskt lönsamt i slutändan innan en sådan stor investering är värd att göras.

### **Klimatförändringarnas påverkan**

Eftersom klimatet är avgörande för hur svampen kan sprida sig och växa så kan ett förändrat klimat med högre temperaturer och förändrat regnmönster även påverka utbredningen av svamparna. *N. ditissima* smittar genom sporer som sprids med vind och regn och mängden regn per år har inverkan på hur mycket fruktträdkräfta som finns i området. Detta leder till att det kan skilja sig i områden som ligger relativt nära varandra beroende på hur mycket regn som brukar falla (Weber 2014). *Colletotrichum* spp. smittar genom konidiesporer när det regnar och *Neofabraea* spp. angriper frukt vid fuktiga förhållanden och smittan kan därför öka vid regnigt väder (Jordbruksverket 2014).

Enligt IPCCs rapport 2022 (IPCC 2022) har den globala medeltemperaturen ökat med 1,1°C 2011-2020 i jämförelse med 1850-1900. Högre temperaturer och förändrat regnmönster kan leda till att vi i framtiden kan se en större utbredning av svamparna. Vi ser att klimatförändringarna gör det svårare att odla i många delar av världen på grund av torka, samtidigt som befolkningens mängden ökar (United Nations 2023) ökar även behovet av mat. Därför är det mycket viktigt att fortsätta forskningen om patogener inom matproduktion för att utveckla metoder för att minska skador och förluster även i ett förändrat klimat. För de svenska odlarna går det att fortsätta odla äpple även om temperaturen stiger och Sverige har därför stor nytta av att vidareutveckla kunskap och förbättringar för att kunna bli en större del av äppelproduktionen inom EU.

### **Svamppatogener i olika delar av världen**

I flera europeiska länder där det har forskats på svamppatogener som orsakar röta i äppelodlingar samt vid efterskördshantering har det visat sig att det är främst *N. alba* samt *N. perennans* som är de två vanligaste förekommande arterna av *Neofabraea* spp. (Tahir 2014b; Michalecka et al. 2016a; Pešicová et al. 2017; Vico et al. 2016). Resultaten skiljer sig en del mellan länderna på grund av olika geografiska förhållanden men också då svampen har visats ha olika stor utbredning från år till år, då arterna gynnas av olika klimatförhållanden. Tahir (2014b) fick under sina två års tester av svamppatogener i svenska äppelodlingar fram att *Neofabraea* spp. var den viktigaste växtpatogena svampen vid

efterskördshantering hos 6 äppelsorter och orsakade upp till 50% av lagringsförlusterna. Av de frukter som var infekterade av *Neofabraea* spp. var 40 % angripna av *N. alba* och 50 % av *N. perennans*. Resterande 10% förblev oidentifierade.



## Slutsats

Då utbredningen av svamparna kan skilja sig väldigt mycket mellan både år och regioner, beroende på väder- och odlingsförhållanden, krävs det mer forskning på sjukdomarna just i svensk äppelodling. Genom att få mer kunskap om vilka väderförhållanden som är optimala för de olika svamparna kan utbredningen förutspås bättre och förebyggande åtgärder kan appliceras och således minska odlingsförlusterna. Även utvecklad kunskap om korrekta lagringsförhållanden för att minska uppkomsten av lagringsröta är nödvändigt för att minska de ekonomiska förluster som dessa orsakar.

Kolonimorfologi kan användas för att få bättre förståelse för vilken patogen som är förekommande men det är ingen garanterad metod och kräver stor kunskap och erfarenhet av utföraren för att möjliggöra identifiering. Ingen *Neonectria ditissima* kunde identifieras på äpplen med lenticellröta med hjälp av kolonimorfologi och det går därför inte, baserat på våra provsvar, säga att *N. ditissima* kan identifieras i lenticellrötter. qPCR kan användas som en effektiv metod att identifiera *Neofabraea* spp. men det krävs vidare utveckling i metoden för att artbestämning. Vidare krävs det mer forskning och utveckling för att ta fram ett effektivt protokoll för molekylär identifiering av *Colletotrichum* spp. isolerad från äppelfrukt.

## Källhänvisning

- Abbott, C.P. & Beckerman, J.L. (2018). Incorporating Adjuvants with Captan to Manage Common Apple Diseases, *Plant Disease*, 102(1), pp. 231–236.  
<https://doi.org/10.1094/pdis-05-17-0629-re>
- Aguilar, C.G., Mazzola, M. & Xiao, C.L. (2017). Control of Bull’s-Eye Rot of Apple Caused by *Neofabraea perennans* and *Neofabraea kienholzii* Using Pre- and Postharvest Fungicides, *Plant Disease*, 102(5), pp. 905-910.  
<https://doi.org/10.1094/pdis-09-17-1363-re>
- Aguilar, C.G., Mazzola, M. & Xiao, C.L. (2019) Timing of Perennial Canker Development in Apple Trees Caused by *Neofabraea perennans* and *Neofabraea kienholzii*, *Plant Disease*, 103(3), pp. 555-562.  
<https://doi.org/10.1094/pdis-06-18-0935-re>
- Cameldi, I. Neri, F. Menghini, M. Pironi, A. Nanni, I. M. Collina, M. & Mari, M. (2017). Characterization of *Neofabraea vagabunda* isolates causing apple bull’s eye rot in Italy (Emilia-Romagna region), *Plant Pathology*, 66(9), pp. 1432–1444. <https://doi.org/10.1111/ppa.12684>
- Carneiro, G.A. Walcher, M. Storti, A. & Baric, S. (2022). Phylogenetic Diversity and Phenotypic Characterization of *Phlyctema vagabunda* (syn. *Neofabraea alba*) and *Neofabraea kienholzii* Causing Postharvest Bull’s Eye Rot of Apple in Northern Italy, *Plant Disease*, 106(2), pp. 451–463.  
<https://doi.org/10.1094/pdis-04-21-0687-re>.
- Carneiro, G.A. & Baric, S. (2021). *Colletotrichum fioriniae* and *Colletotrichum godetiae* Causing Postharvest Bitter Rot of Apple in South Tyrol (Northern Italy), *Plant Disease*, 105(10), pp. 3118–3126.  
<https://doi.org/10.1094/pdis-11-20-2482-re>
- Chaverri, P. Salgado, C. Hirooka, Y. Rossman, A.Y. & Samuels, G.J. (2011). Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs, *Studies in Mycology*, 68, pp. 57–78.  
<https://doi.org/10.3114/sim.2011.68.03>
- Chen, C. Verkley, G.J.M. Sun, G. Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. (2016). Redefining common endophytes and plant pathogens in *Neofabraea*, *Pezizula*, and related genera, *Fungal Biology*, 120(11), pp. 1291–1322.  
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.09.013>.
- De Jong, S.N. Lévesque, A.C. Verkley, G.J.M. Abeln, E.C.A. Rahe, J.E. Braun, P.G (2001). Phylogenetic relationships among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull’s-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA, and the  $\beta$ -tubulin gene, *Mycological Research*, 105(6), pp. 658–669.  
<https://doi.org/10.1017/s0953756201003926>
- European Commission, Agriculture, and rural development. Pip fruit statistics (2023).

- [https://agriculture.ec.europa.eu/data-and-analysis/markets/overviews/market-observatories/fruit-and-vegetables/pip-fruit-statistics\\_en](https://agriculture.ec.europa.eu/data-and-analysis/markets/overviews/market-observatories/fruit-and-vegetables/pip-fruit-statistics_en)
- Ferrer, C. Colom, F. Frases, S. Mulet, E. Abad, J.L. & Alió, J.L. (2001). Detection and Identification of Fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S Ribosomal DNA Typing in Ocular Infections, *Journal of Clinical Microbiology*, 39(8), pp. 2873–2879.  
<https://doi.org/10.1128/jcm.39.8.2873-2879.2001>
- Gariépy, TD. Lévesque, CA. de Jong, SN. & Rahe, JE. (2003). Species specific identification of the *Neofabraea* pathogen complex associated with pome fruits using PCR and multiplex DNA amplification. *Mycological Research* 107, 528– 36. <https://doi.org/10.1017/S0953756203007810>
- Gelain, J., De Albuquerque Pereira, W.C. & De Mio, L.L.M. (2021). Detection and characterization of quiescent infections of *Neonectria ditissima* in Brazilian commercial apple fruit, *Tropical Plant Pathology*, 46(1), pp. 31–36. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00412-2>
- González, E., Sutton, T.B. & Correll, J.C. (2006). Clarification of the Etiology of Glomerella Leaf Spot and Bitter Rot of Apple Caused by *Colletotrichum* spp. Based on Morphology and Genetic, Molecular, and Pathogenicity Tests, *Phytopathology*, 96(9), pp. 982–992.  
<https://doi.org/10.1094/phyto-96-0982>
- Henriquez, J.L., Sugar, D. & Spotts, R.A. (2004). Etiology of Bull’s Eye Rot of Pear Caused by *Neofabraea* spp. in Oregon, Washington, and California, *Plant Disease*, 88(10), pp. 1134–1138.  
<https://doi.org/10.1094/pdis.2004.88.10.1134>
- Hu, M.-J., Grabke, A. & Schnabel, G. (2015). Investigation of the *Colletotrichum gloeosporioides* Species Complex Causing Peach Anthracnose in South Carolina, *Plant Disease*, 99(6), pp. 797–805.  
<https://doi.org/10.1094/pdis-10-14-1076-re>
- IPCC (2022). Summary for Policymakers. Pörtner, H.-O. Roberts, D.C. Poloczanska, E.S. Mintenbeck, K. Tignor, M. Alegría, A. Craig, M. Langsdorf, S. Löschke, S. Möller, V. & Okem, A.(eds.)]. In: *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Pörtner, H.-O. Roberts, D.C. Tignor, M. Poloczanska, E.S. Mintenbeck, K. Alegría, A. Craig, M. Langsdorf, S. Löschke, S. Möller, V. Okem, A. & Rama, B. (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, pp. 3-33. <https://doi:10.1017/9781009325844.001>
- Jayawardena, R.S. Hyde K.D. Damm, U. Cai, L. Liu, M. Li, X.H. Zhang, W. Zhao, W.S. & Yan, J.Y. (2016). Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*, *Mycosphere*, 7(8), pp. 1192–1260.  
<https://doi.org/10.5943/mycosphere/si/2c/9>

- Jordbruksverket (2014). Växtskydd i ekologisk fruktodling.  
[http://www2.jordbruksverket.se/webdav/files/SJV/trycksaker/Pdf\\_ovrigt/ovr228v3.pdf](http://www2.jordbruksverket.se/webdav/files/SJV/trycksaker/Pdf_ovrigt/ovr228v3.pdf)
- Jordbruksverket (2022). Skörd av trädgårdsväxter 2022.  
<https://jordbruksverket.se/om-jordbruksverket/jordbruksverkets-officiella-statistik/jordbruksverkets-statistikrapporter/statistik/2023-03-28-skord-av-tradgardsvaxter-2022>
- Khodadadi, F. González, J.B. Martin, P.L. Giroux, E. Bilodeau, G.J. Peter, K.A. Doyle, V.P. & Acimović, S.G. (2020). Identification and characterization of *Colletotrichum* species causing apple bitter rot in New York and description of *C. noveboracense* sp. nov., *Scientific Reports*, 10(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-66761-9>
- Lantbruksnytt (2023). Frukträdskräfta i äppelagring undersöks [Webb-TV]. 22 februari. <https://lantbruksnytt.se/tv/video/3057/> [2023-05-20]
- Martin, P.L. Krawczyk, T. Pierce, K. Thomas, C. Khodadadi, F. Acimović, S.G. & Peter, K.A. (2022). Fungicide Sensitivity of *Colletotrichum* Species Causing Bitter Rot of Apple in the Mid-Atlantic U.S.A., *Plant Disease*, 106(2), pp. 549–563. <https://doi.org/10.1094/pdis-06-21-1142-re>
- Michalecka, M. Bryk, H. Poinatowska, A. Seliga, P. & Puławska, J. (2016a). Identification and characterization of *Neofabraea* fungi causing bull's eye rot on apple in Poland, *Acta Horticulturae*, (1144), pp. 183–188.  
<https://doi.org/10.17660/actahortic.2016.1144.26>
- Michalecka, M., Bryk, H., Poniatowska, A. & Puławska, J. (2016b). Identification of *Neofabraea* species causing bull's eye rot of apple in Poland and their direct detection in apple fruit using multiplex PCR, *Plant Pathology*, 65(4), pp. 643–654. <https://doi.org/10.1111/ppa.12449>
- Neri, F. Mari, M. Brigati, S. & Bertoligi, P. (2009). Control of *Neofabraea alba* by plant volatile compounds and hot water, *Postharvest Biology and Technology*, 51(3), pp. 425–430.  
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.08.006>
- Oo, M.M. Yoon, H-Y. Jang, H.A. & Oh, S-K. (2018). Identification and Characterization of *Colletotrichum* Species Associated with Bitter Rot Disease of Apple in South Korea, *Plant Pathology Journal (Suwon)*, 34(6), pp. 480–489. <https://doi.org/10.5423/ppj.ft.10.2018.0201>
- Pešicová, K. Kolařík, M. Hortová, B. & Novotný, D. (2017). Diversity and identification of *Neofabraea* species causing bull's eye rot in the Czech Republic, *European Journal of Plant Pathology*, 147(3), pp. 683–693.  
<https://doi.org/10.1007/s10658-016-1036-1>
- Spotts, R.A. Seifert, K.A. Wallis, K.M. Sugar, D. Xiao, C.L. Serdani, M. & Henriquez, J.L. (2009) Description of *Cryptosporiopsis kienholzii* and species profiles of *Neofabraea* in major pome fruit growing districts in the

- Pacific Northwest USA, *Mycological Research*, 113(11), pp. 1301–1311.  
<https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.08.013>
- Tahir, I. (2006). Control of Pre- and Postharvest Factors to Improve Apple Quality and Storability. Faculty of Landscape Planning, Horticulture and Agricultural Science Department of Crop Sciences. Dis. Doc. SLU Alnarp.
- Tahir, I. (2014a). *Fruktodling och efterskördbehandling*. Visionmedia Syd.  
<https://pub.epsilon.slu.se/11870/>
- Tahir, I. (2014b) Vad är det som förtär äpple under lagring, (Landskapsarkitektur Trädgård Växtproduktionsvetenskap 2014:14) Alnarp: Sveriges lantbruksuniversitet Fakulteten för landskapsarkitektur, trädgårds- och växtproduktionsvetenskap. <https://pub.epsilon.slu.se/11224/>
- United Nations (2023) Population | United Nations.  
<https://www.un.org/en/global-issues/population>
- Vico, I. Duduk, N. Vasić, M. Žebeljan, A. & Radivojević, D. (2016) Bull's eye rot of apple fruit caused by *Neofabraea alba*, *Acta Horticulturae*, (1139), pp. 733–738. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2016.1139.125>
- Weber, R.W.S. (2014) Biology and control of the apple canker fungus *Neonectria ditissima* (syn. *N. galligena*) from a Northwestern European perspective, *Erwerbs-obstbau*, 56(3), pp. 95–107.  
<https://doi.org/10.1007/s10341-014-0210-x>
- Weir, B.S., Johnston, P.R. & Damm, U. (2012) The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex, *Studies in Mycology*, 73, pp. 115–180.  
<https://doi.org/10.3114/sim0011>
- Xu, X.M. & Robinson, J.D. (2010) Effects of fruit maturity and wetness on the infection of apple fruit by *Neonectria galligena*, *Plant Pathology*, 59(3), pp. 542–547. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02232.x>
- Åkesson, I. & Boysen, B. (2005). *Fruktträdkräfta / Lövträdkräfta*. [Faktablad]. Faktablad om Växtskydd Trädgård. Uppsala: SLU.  
[https://pub.epsilon.slu.se/18191/1/%C3%85kesson\\_I\\_et\\_al\\_201109.pdf](https://pub.epsilon.slu.se/18191/1/%C3%85kesson_I_et_al_201109.pdf)  
 [2023-04-26]