



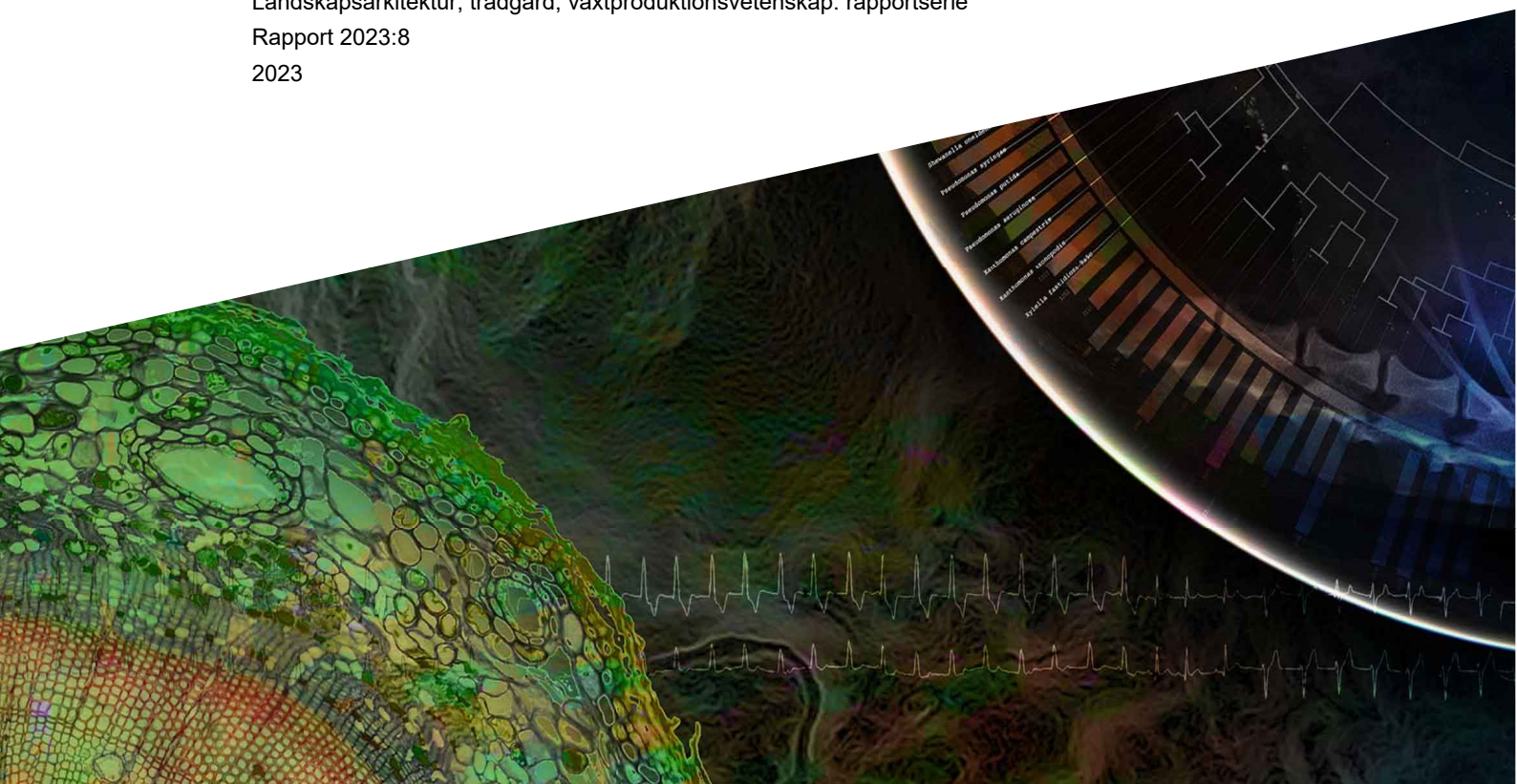
# Molekylära tester av utsädets skjutkraft

Fall: Höstvet

---

Beatrix Alsanius, Gustaf Forsberg, Anna Karin Rosberg, Christian Thaning, Maria Karlsson

Sveriges lantbruksuniversitet, SLU  
Fakulteten för landskapsarkitektur, trädgårds- och växtproduktionsvetenskap  
Institutionen för biosystem och teknologi  
Landskapsarkitektur, trädgård, växtproduktionsvetenskap: rapportserie  
Rapport 2023:8  
2023





## Molekylära tester av utsädets skjutkraft. Fall: höstvetete

Beatrix Alsanius, <https://orcid.org/0000-0001-6300-2829>, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biosystem och teknologi, Ämnesgrupp Hortikulturell mikrobiologi

Gustaf Forsberg, <https://orcid.org/0000-0002-1459-1265>, Lantmännen BioAgri

Anna Karin Rosberg, <https://orcid.org/0000-0002-4851-7354>, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biosystem och teknologi, Ämnesgrupp Hortikulturell mikrobiologi

Christian Thaning, <https://orcid.org/0009-0002-1491-9934>, Lantmännen BioAgri

Maria Karlsson, <https://orcid.org/0000-0002-7414-9022>, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biosystem och teknologi, Ämnesgrupp Hortikulturell mikrobiologi

<b>Utgivare:</b>	Sveriges lantbruksuniversitet, Inst. f. biosystem och teknologi
<b>Utgivningsår:</b>	2023
<b>Utgivningsort:</b>	Alnarp
<b>Upphovsrätt:</b>	Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.
<b>Serietitel:</b>	Landskapsarkitektur, trädgård, växtproduktionsvetenskap: rapportserie
<b>ISBN (tryckt version):</b>	978-91-8046-918-0
<b>ISBN (elektronisk version):</b>	978-91-8046-919-7
<b>DOI:</b>	<a href="https://doi.org/10.54612/a.2vfd0h8mns">https://doi.org/10.54612/a.2vfd0h8mns</a>
<b>Nyckelord:</b>	<i>Fusarium</i> spp., glukos, höstvetete, metabolom, metagenom, myo-inositol, skjutkraft, Thermoseed®, värmebehandling

© 2023 Beatrix Alsanius, Maria Karlsson, Anna Karin Rosberg

Detta verk är licenserat under CC BY 4.0. se <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## Sammanfattning

Termisk utsädesbehandling anses vara ett miljövänligt alternativ till traditionell fungicidbehandling. Rambetingelserna för termisk behandling (t.ex. temperatur, fuktighet, varaktighet, luftflöde) är väsentliga för att bibehålla fröets skjutkraft. Val av behandlingsparametrar påverkas av produktionsplats, mognadsgrad och frökvalitet och måste justeras för varje enskilt utsädesparti. Detta projekt syftade till att ta fram ett underlag för snabbtester för att ge en prognos om behandlingsparametrar. Studien genomfördes som ett tvåfaktoriellt experiment, med faktor 1: behandlingsintensitet (exponering för ingen eller fyra ökande intensitetssteg) och faktor 2: förbehandling (med eller utan blötläggning). Studien genomfördes i två steg, nämligen screening följt av validering. Skjutkraft och sjukdomsförekomst analyserades med hjälp av biotester. Behandlingens inverkan på fröets fysiologiska egenskaper karakteriserades med hjälp av metabolom-, proteom- samt lipidomanalys, medan Illumina MiSeq användes för att beskriva sammansättningen av mikrobiella samhällen i spermosfären. Förekomst av *Fusarium* spp. och *Microdochium* spp. följdes upp med droplet digital PCR. Måttlig behandlingsintensitet minskade antalet infekterade frön och ökade uppkomsten. Förbehandling genom blötläggning var en förutsättning för identifiering av nyckelsubstanser. Koncentration av myo-inositol och förhållandet mellan myo-inositol/glukos var positivt medan koncentration av glukos och citronsyra var negativt korrelerade med behandlingsintensiteten i blötlagda prover. Skärningspunkten mellan myo-inositol och glukos föreföll stämma överens med optimal skjutkraft. Varken analys av lipidom eller proteom korrelerade med skjutkraften. Blötläggning förändrade sammansättningen av bakterie- och svampsamhällen av höstvetefrö, men inga organismer eller grupper av organismer avgörande för skjutkraft kunde identifieras utifrån DNA-baserade metoder. Föreliggande resultat behöver valideras. Vid validering bör metagenomanalysen bygga på RNA-snarare än DNA-extraktion. Som valideringsintervall föreslås behandlingsintensiteter 4.5-6.

*Nyckelord:* *Fusarium* spp., glukos, höstvetete, metabolom, metagenom, myo-inositol, sjukdomsförekomst, skjutkraft, Thermoseed®, värmebehandling

## Abstract

Thermal seed treatment is considered an environmentally friendly alternative to traditional fungicide treatment. The framework conditions for thermal treatment (e.g. temperature, humidity, duration, air flow) are essential to maintain seed vigor. The choice of treatment parameters is influenced by production site, maturity level and seed quality and must be adjusted for each individual seed lot. This project aimed to provide a basis for rapid tests to predict treatment parameters. The study was conducted in two-factor experiments, with factor 1: treatment intensity (exposure to no or four increasing intensity steps) and factor 2: pretreatment (with or without soaking). The study was conducted in two stages, namely screening followed by validation. Vigor and disease incidence were analyzed using bioassays. The impact of the treatment on the physiological properties of the seeds was characterized using metabolome, proteome and lipidome analysis, while Illumina MiSeq was used to describe the composition of microbial communities in the spermosphere. The presence of *Fusarium* spp. and *Microdochium* spp. was monitored by droplet digital PCR. Moderate treatment intensity reduced the number of infected seeds and increased vigor. Pretreatment by soaking was a prerequisite for the identification of key

compounds. Myo-inositol concentration and myo-inositol/glucose ratio correlated positively while glucose and citric acid concentration were negatively to treatment intensity in soaked samples. The intersection of myo-inositol and glucose appeared to be consistent with optimal vigor. No compound identified in lipidome nor proteome analysis correlated vigor. Soaking altered the composition of bacterial and fungal communities of winter wheat seeds, but no key organisms or groups of organisms critical to vigor could be identified by DNA-based methods. The present results need to be validated. For validation, metagenomic analysis should be based on RNA rather than DNA extraction. Treatment intensities of 4.5-6 are suggested as validation intervals.

*Keywords:* disease incidence, *Fusarium* spp., glucose, metabolome, metagenome, myo-inositol, thermal treatment, Thermosteed®, vigor

# Innehållsförteckning

<b>Tabellförteckning .....</b>	<b>8</b>
<b>Figurförteckning.....</b>	<b>9</b>
<b>Förkortningar.....</b>	<b>11</b>
<b>1. Bakgrund .....</b>	<b>12</b>
1.1 Syfte .....	14
1.2 Frågeställningar .....	14
1.3 Definitioner .....	14
<b>2. Resultat .....</b>	<b>16</b>
2.1 Skjutkraft och sjukdomsförekomst .....	16
2.1.1 Effekt av förbehandling genom blötläggning .....	16
2.1.2 Effekt av värmebehandling på blötlagda frö .....	16
2.2 Metabolom .....	17
2.2.1 Val av analysmetod .....	17
2.2.2 Effekt av förbehandling på samspel mellan metabolom och behandlingsintensitet .....	17
2.2.3 Effekt av förbehandling på samspel mellan behandlingsintensitet samt proteom och lipidom .....	18
2.2.4 Interaktion mellan metabolom och skjutkraft samt sjukdomsförekomst .....	18
Metagenom .....	22
2.2.5 Effekt av för- och värmebehandling på mikrobiella samhällen på fröskalet och i fröet (malda prover).....	22
2.2.6 Effekt av för- och värmebehandling på mikrobiella samhällen på fröskalet ..	24
<b>3. Diskussion och slutsatser .....</b>	<b>27</b>
<b>4. Material och metoder.....</b>	<b>30</b>
4.1 Utsäde och utsädesbehandling .....	30
4.2 Biotester .....	31
4.3 Mikrobiell analys .....	31
4.3.1 DNA extraction.....	31
4.3.2 droplet digital PCR (ddPCR).....	31
4.3.3 Illumina sequencing Metagenomics .....	32
4.4 Metabolomanalys .....	32

4.5 Statistisk analys ..... 32

**Referenser..... 34**

**Tack 36**

# Tabellförteckning

Tabell 1. Definitioner .....	14
Tabell 2: Pearson korrelation mellan skjutkraft respektive sjukdomsförekomst av värmebehandlat utsäde av höstvetete med hänsyn till valda kolhydrater och organiska syror. $P < 0,05$ . Enbart korrelationer med $p < 0,05$ visas. ....	21



## Figurförteckning

- Figur 1. Samspel mellan behandlingsintensitet vid termisk utsädesbehandling och fröets skjutkraft samt sjukdomsangrepp av frö (Illustration: © G. Forsberg). ..... 12
- Figur 2. Samspel mellan frö (övre rad) och spermosfärmikrobiotan (nedre rad) under groningen och groddplantsutvecklingen. Röda symboler markerar epifyter, d.v.s. organismer som koloniserar fröskalet, medan blåa symboler står för endofyter, d.v.s. organismer som koloniserar fröets inre. Figuren är översatt och reproducerad med några modifikationer från Alsanius och Wohanka (2019), med tillstånd av Elsevier (request ID: 600138040). ..... 13
- Figur 3. Effekt av värmebehandlingens intensitet på skjutkraft (A) av och sjukdomsförekomst (B) på höstvetete. Staplar markerade med asterisk avviker från kontrolledet (intensitet 0) ( $p < 0,05$ )..... 17
- Figur 4. Koncentrationer av citronsyra (A), glukos (B), myo-inositol samt kvoten mellan myo-inositol/glukos i höstvetefrö som värmebehandlats med stigande intensitet..... 18*
- Figur 5. Interaktioner mellan sjukdomsförekomst och skjutkraft av samt koncentration av myo-inositol i värmebehandlade höstvetefrö. Utsädet hade värmebehandlats vid fyra intensiteter (röd = intensitet 3, grön = intensitet 5, violet = 6, grå = 7) eller inte värmebehandlats alls (blå). Cirklarnas diameter indikerar koncentration av myo-inositol. .... 19
- Figur 6. Samspel mellan koncentrationen av myo-inositol och glukos i höstvetefrö samt utsädet skjutkraft i relation till värmebehandlingens intensitet. Ekvationen beskriver det polynomala förloppet av trendlinjen för skjutkraft samt dess sannolikhet..... 20
- Figur 7. Relativ abundans av bakteriesläkten i malda höstvetefrö. i=imbiberad (blötlagd). ..... 23
- Figur 8. Relativ abundans av svamparter i malda höstvetefrö. i=imbiberad (blötlagd)..... 23
- Figur 9. Relativ abundans av bakterier på släktnivå extraherade från hela höstvetefrö. Bakterierarter som var vanligare än 2 % beaktades. i=imbiberad (blötlagd).... 25
- Figur 10. Relativ abundans av svamparter extraherade från hela höstvetefrön. Arter som var vanligare än 2 % beaktades. i=imbiberad (blötlagd). ..... 26

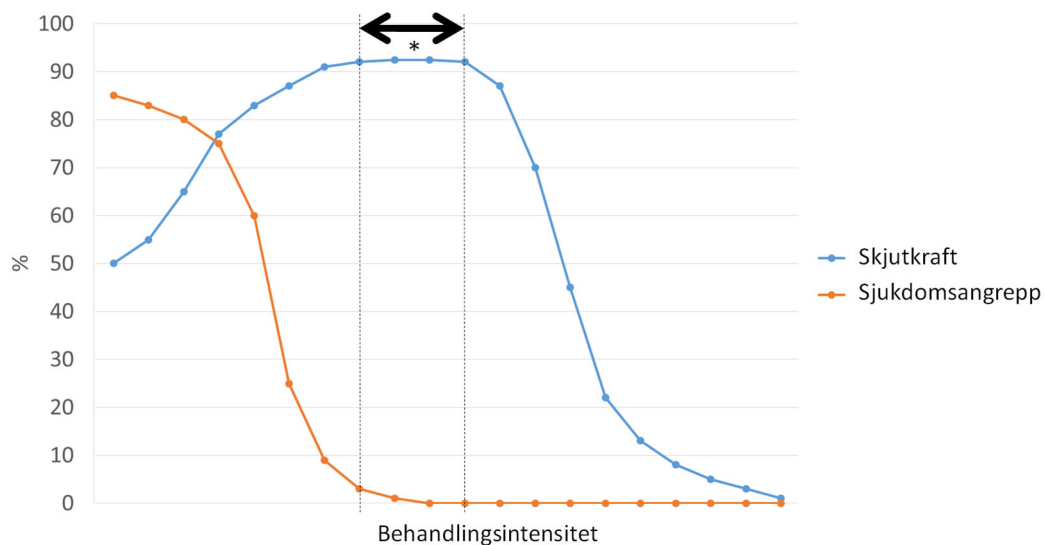
Figur 11. Flödesschema över förbehandlingar och analyser ..... 30

## Förkortningar

ddPCR	Droplet digital PCR
GC-MS	Gas chromatography–mass spectrometry
LC-MS	Liquid chromatography–mass spectrometry

# 1. Bakgrund

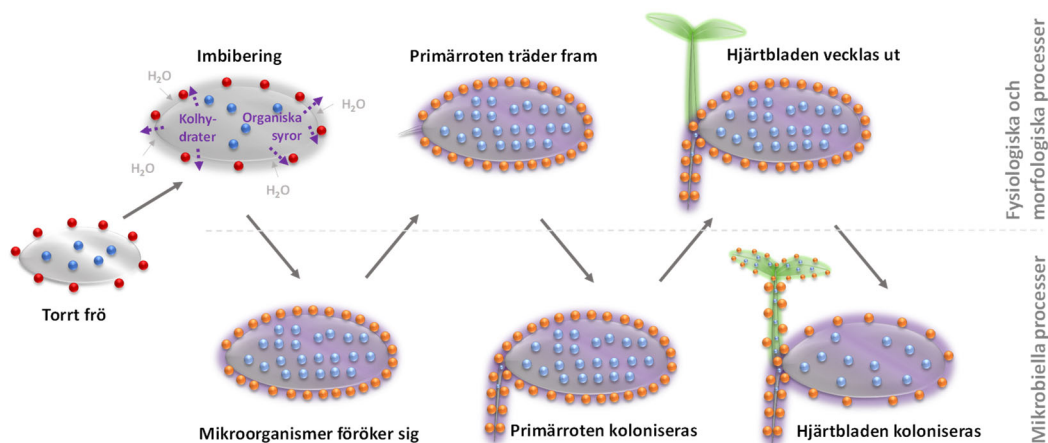
Termisk utsädesbehandling är ett miljövänligt alternativ till traditionell fungicidbehandling. Rambetingelserna för termisk behandling (t.ex. temperatur, fuktighet, varaktighet, luftflöde) är väsentliga för att bibehålla fröets skjutkraft. Nivån på behandlingsparametrarna måste justeras för varje enskilt utsädesparti och påverkas bland annat av produktionsplats, mognadsgrad och frökvalitet. Med ökande behandlingsintensitet minskas sjukdomsangreppet (Gilbert et al., 2005). Samtidigt påverkas fröets skjutkraft negativt när behandlingsintensiteten blir för hög (Figur 1). Biotester som indikerar skjutkraft tar vanligen 2 veckor. Det behövs alltså tillförlitliga snabbmetoder som indikerar de optimala behandlingsparametrarna.



Figur 1. Samspel mellan behandlingsintensitet vid termisk utsädesbehandling och fröets skjutkraft samt sjukdomsangrepp av frö (Illustration: © G. Forsberg).

Groningsprocessen för fröer illustreras i figur 2. Fröskalet och fröets inre (*spermosfären*) är koloniserade av mikroorganismer (t.ex. svampar och bakterier). Fröet och de koloniserande organismerna ingår i ett perfekt samspel under groningsfasen. Både frö och mikroorganismer lämnar sin vilofas så snart fröet kommer i kontakt med vatten; så kallad imbibering. Imbibering är startskottet för en tre-stepsprocess. Under imbibering tas vatten upp först passivt, sedan aktivt. Processen är beroende av markens vattenpotential, diffusivitet, kapillaritet, fröets egenskaper (vattenpotential samt diffusionsförmåga) samt vattenbetingelserna vid gränssnittet mark-frö. Under den

följande övergångsfasen sker inga större förändringar i fröets vattenupptagning. Den tredje fasen karakteriseras av en mycket snabb ökning i vattenupptagning och varar tills primärroten bryter fram. Det är då groningenprocessen är avslutad (Bewley et al., 2013). Groningen åtföljs av groddplantsutvecklingen. I denna fas mobiliseras organiska ämnen som funnits lagrade i fröet. Dessa konsumeras, till viss del, av mikrobiotan som förökar sig och koloniserar groddens yta samt i dess inre (Bergna et al., 2019). Samspelet mellan mikroorganismer och frö kan vara symbiotiskt, men mikroorganismerna kan också vara tillväxtbefrämjande eller –hämmande. Exempel på tillväxtbefrämjning är mikrobiell produktion av växthormoner, eller motverkan av sjukdomsalstrare genom antagonism, konkurrens om plats och näring, eller genom hyperparasitism. Tillväxthämning kan yttra sig genom sjukdomsangrepp eller produktion av växtskadliga toxiner (*fytotoxisk*). Det finns indikationer på att mikrobiomet i spermosfären är beroende av växtslag och sort samt habitatets egenskaper (Adam et al., 2018; Fuernkranz et al., 2012; Matsumoto et al., 2021; Wassermann et al., 2022).



Figur 2. Samspel mellan frö (övre rad) och spermosfärmikrobiotan (nedre rad) under groningen och groddplantsutvecklingen. Röda symboler markerar epifyter, d.v.s. organismer som koloniserar fröskalet, medan blåa symboler står för endofyter, d.v.s. organismer som koloniserar fröets inre. Figuren är översatt och reproducerad med några modifikationer från Alsanius och Wohanka (2019), med tillstånd av Elsevier (request ID: 600138040).

Det traditionellt viktigaste måttet på utsädets kvalitet är dess grobarhet, som är dess förmåga att gro och därmed ge upphov till en primärrot. Ett mer krävande mått på utsädets kvalitet som inte varit så vanligt att använda, men som är på frammarsch, är utsädets skjutkraft. Skjutkraften är utsädets avgörande egenskap att kunna skapa starka och livskraftiga groddplantor som klarar att snabbt ta sig upp genom jorden under stressade förhållanden. Då skjutkraften inte är direkt korrelerad till grobarheten har bestämning av skjutkraft av stort värde, eftersom den bättre visar utsädets potential att bli en bra gröda i fält.

Vi undersökte därför i föreliggande projekt, om sammansättningen av fröets metaboliter eller mikrobiom förändras i relation till värmebehandlingens intensitet och

om det finns kandidatsubstanser eller –organismer/grupper av organismer som kan indikera fröets skjutkraft.

Detta projekt har genomförts i samarbete mellan SLU, BioAgri AB och ThermoSeed AB. Det har finansierats genom Lantmännens Forskningsstiftelse och Partnerskap Alnarp.

## 1.1 Syfte

Syftet är att från molekylära (genetiska resp. metabolomiska/proteomiska) analysmetoder kunna utveckla en metod för snabba skjutkraftstester för utsäde. Detta görs med avseende att kunna garantera lantbrukarna ett högproduktivt utsäde, samt att det möjliggör

- En höjd kvalitet på utsäde till lantbrukarna jämförbar med kemisk behandling, och
- En ökad andel utsäde som behandlas med andra metoder än med kemiska bekämpningsmedel, så som värmebehandling (ThermoSeed®) och andra tekniker.

## 1.2 Frågeställningar

- Vilka organismer resp. grupper av organismer är kopplade till stark/svag skjutkraft?
- Vilka molekyler i frön, samt vilka utsädesburna svampar, är kopplade till stark/svag skjutkraft hos friskt eller infekterat utsäde?
- Vilka organismer/grupper av organismer eller molekyler av ovanstående kan utgöra en lämplig bas för ett reguljärt snabbtest?

## 1.3 Definitioner

Tabell 1. Definitioner

Begrepp	Definition	Engelskt begrepp
Abundans	Förekomst	Abundance
Alfaversitet	Artmångfald på lokal nivå som beskriver artmångfalden (artrikedomen) inom ett funktionellt samhälle (tex. på fröytan)	Alpha diversity
Behandlingsintensitet	Nivå av temperatur, luftfuktighet, luftflöde och tid	Treatment intensity
Betaversitet	Förhållandet mellan regional och lokal artdiversitet	Beta diversity
Endofyt	Organism som lever på insidan av växten	Endophyte

Epifyt	Organism som lever på växtytan (t.ex. på utsidan av frö, blad, stam, rot)	Epiphyte
Grobarhet	Procentuell andel av frö som kan bilda en primärrot	Germination rate
Groning	Processen som startar med vattenupptag av det torra fröet och slutar med framträdande av primärroten	Germination
Lipidom	Den totala halten av lipider i en organism, cell eller vävnad	Lipidome
Metabolom	Det totala antalet metaboliter i en organism, cell eller vävnad.	Metabolome
Metagenom	Genetiskt material som extraherats, och sekvenserats, från en definierad miljö; till exempel från ett frö.	Metagenome
Mikrobiom	Genetiskt material från alla mikroorganismer i en definierad miljö; till exempel de mikroorganismer som koloniserar ett frö.	Microbiome
Mikrobiota	De mikroorganismer som finns i en definierad miljö.	Microbiota
Proteom	Den totala halten av proteiner i en organism, cell eller vävnad	Proteome
Relativ abundans	Procentuell förekomst	Relative abundance
Sjukdomsförekomst	Procentuellt antal infekterade frön	Disease incidence, Infection rate
Skjutkraft	Utsädet förmåga att kunna skapa starka och livskraftiga groddplantor som klarar att snabbt ta sig upp genom jorden till jordytan under stressade förhållanden	Vigor
Uppkomst	Den tidpunkt då fröplantan tagit sig upp genom jordytan och börjar använda sig av fotosyntes som energikälla.	Emergence
Värmebehandling	Användning av värme för avdödning av skadliga mikroorganismer.	Thermal treatment

## 2. Resultat

### 2.1 Skjutkraft och sjukdomsförekomst

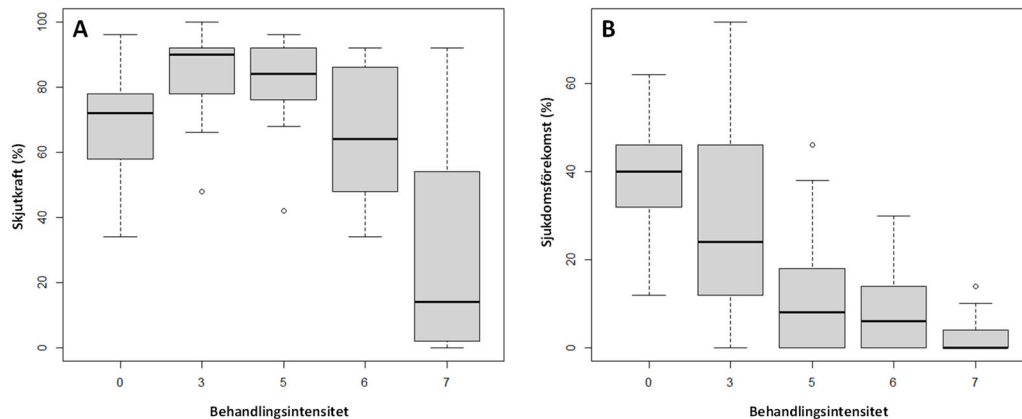
#### 2.1.1 Effekt av förbehandling genom blötläggning

Som förväntat påverkades sjukdomsförekomsten av värmebehandlingen: den minskade med ökande värmebehandlingsintensitet. Sjukdomsförekomsten i prover som blötlagts och behandlats vid intensitet 5 avvek signifikant från kontrollen. Värmebehandling hade en signifikant positiv effekt på fröets skjutkraft då det behandlades med intensitet 5 ( $p < 0,001$ ). Hög värmebehandlingsintensitet påverkade skjutkraften signifikant negativt ( $p = 0,001$ ). I biotestet inverkade blötläggning inte på fröets förmåga att nå jordytan (*skjutkraft*).

#### 2.1.2 Effekt av värmebehandling på blötlagda frö

Som förväntat visade också resultaten från skjutkraftstestet (Figur 3) på enbart blötlagda prover en signifikant negativ effekt av hög värmebehandling på plantornas skjutkraft ( $p = 0,003$ ). Värmebehandling med intensiteterna 3 och 5 visade en trend till förbättrad skjutkraft, jämfört med kontrollen. Signifikanta skillnader observerades enbart när behandlingsintensiteten låg på 7. Standardavvikelsen mellan replikaten och proverna var stor, vilket delvis förklarar avsaknaden av statistiskt signifikanta skillnader. När det gäller sjukdomsförekomsten fanns det en negativ signifikant effekt av värmebehandlingsintensiteten ( $p < 0,0001$ ). Förekomsten av sjukdomsangrepp förklarade 22 % av variansen i skjutkraft ( $p = 0,047$ ).





Figur 3. Effekt av värmebehandlingens intensitet på skjutkraft (A) av och sjukdomsförekomst (B) på höstvet. Staplar markerade med asterisk avviker från kontrollet (intensitet 0) ( $p < 0,05$ ).

## 2.2 Metabolom

Analys av utsädets metabola profiler omfattade metabolom, proteom samt lipidom i relation till förbehandling och intensitet av värmebehandling samt utsädets skjutkraft och sjukdomsförekomst. Undersökningens mål var

- Att detektera molekyler (såsom kolhydrater, organiska syror, proteiner, peptider, lipider) som är korrelerade till skjutkraft
- Att analysera samvariationen
- Att skapa modeller som är användbara för snabb bedömning av skjutkraft.

Två analysmetoder testades i relation till metabolom, nämligen LC-MS och GC-MS.

### 2.2.1 Val av analysmetod

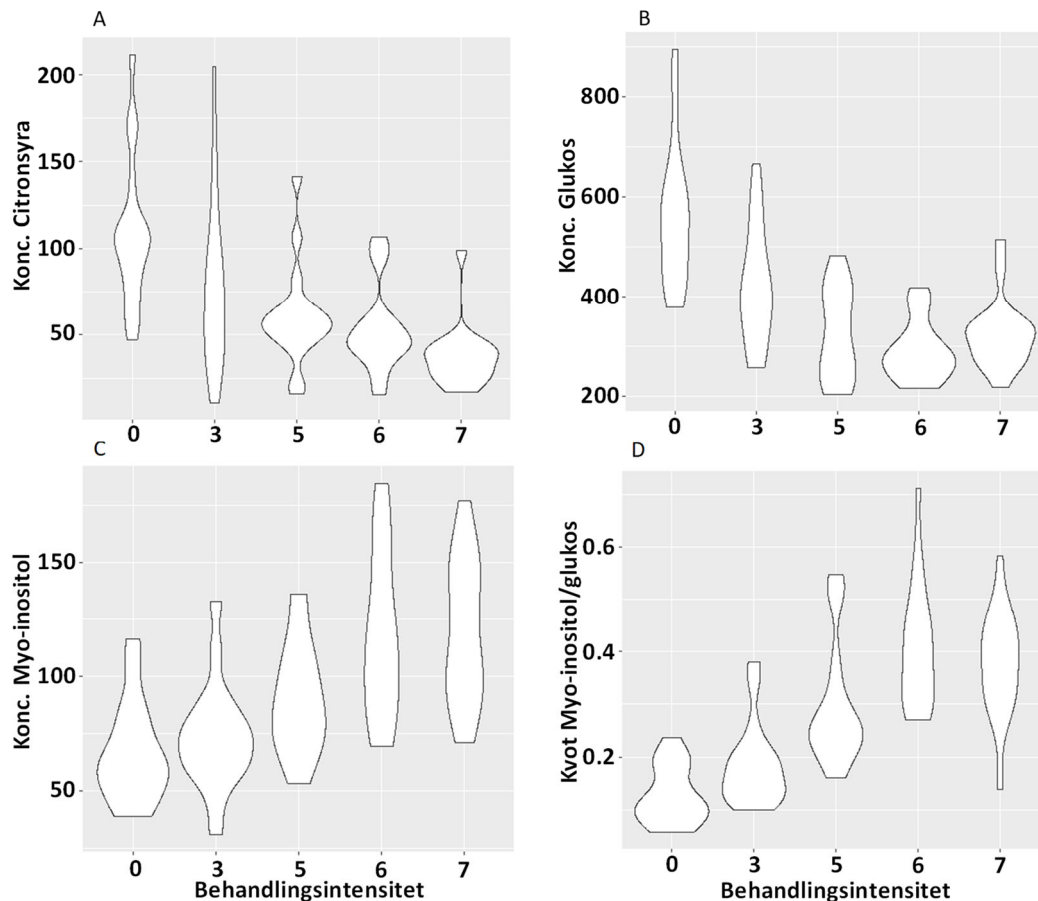
Metabolomets mönster skiljde sig tydligt åt mellan blötlagda och icke-blötlagda prover. Analysmetoden var väsentlig. Den höga upplösningnivån i funktionella substanser som åstadkoms genom ospecificerade LC-MS-metabolomanalys ledde inte till en högre prediktion av värmebehandlingens intensitet, jämfört med den ospecificerade GC-MS-metabolomanalysen.

### 2.2.2 Effekt av förbehandling på samspel mellan metabolom och behandlingsintensitet

GC-MS-analysen visade en tydlig skillnad med hänsyn till förbehandling. Metabolomet av blötlagda prover skilde sig tydligt mellan olika intensiteter av värmebehandling. Intensiteten i värmebehandlingen kunde förutsägas av metaboliter som myo-inositol, citronsyra, sorbitol och raffinosa. Koncentrationerna av myo-inositol och raffinosa ökade, medan citronsyra och sorbitol minskade, med ökad behandlingsintensitet.

För att validera resultaten från den första analysomgången för metabolomik utfördes en andra med endast blötlagda prover. Resultaten bekräftade att citronsyra ( $p < 0,0001$ ) och glukos ( $p < 0,0001$ ) var negativt korrelerade med värmebehandling. Myo-inositol var positivt korrelerat med intensitet av värmebehandling ( $p < 0,0001$ ), och likaså kvoten mellan myo-inositol/glukos ( $p < 0,0001$ ) (

Figur 4).



Figur 4. Koncentrationer av citronsyra (A), glukos (B), myo-inositol samt kvoten mellan myo-inositol/glukos i höstvetefrö som värmebehandlats med stigande intensitet.

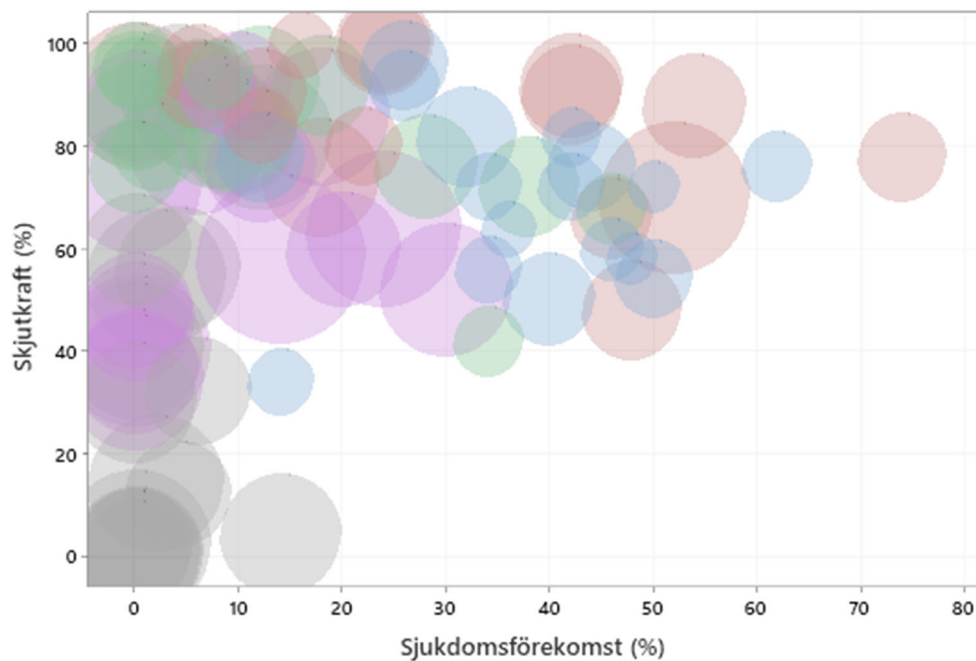
### 2.2.3 Effekt av förbehandling på samspel mellan behandlingsintensitet samt proteom och lipidom

Inga skillnader konstaterades i lipidom eller proteom med hänsyn till förbehandling eller värmebehandlingens intensitet.

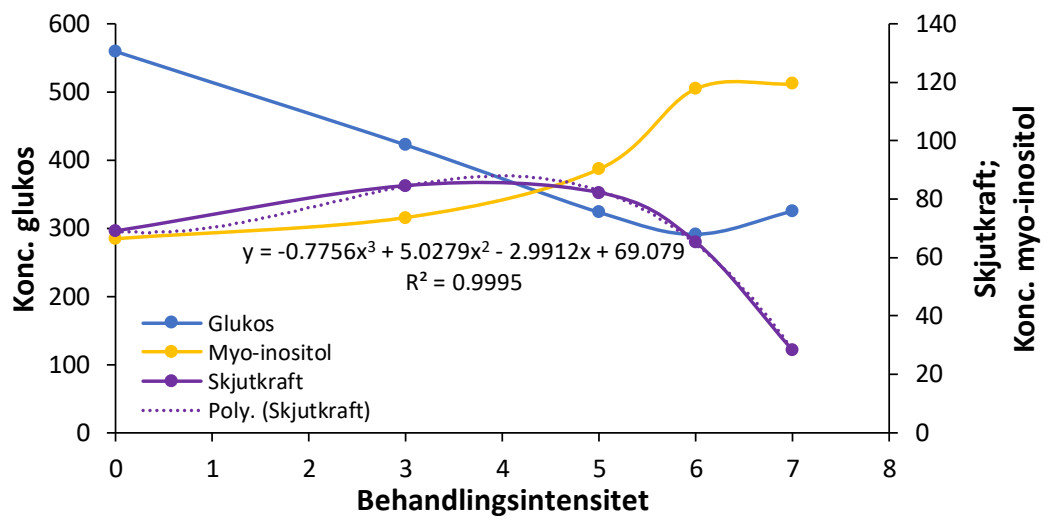
### 2.2.4 Interaktion mellan metabolom och skjutkraft samt sjukdomsförekomst

Låga koncentrationer av myo-inositol ( $R^2 = -31,0\%$ ;  $p = 0,004$ ) var relaterade till hög skjutkraft av höstvetete. Likaså var låga koncentrationer av myo-inositol korrelerade med

hög sjukdomsförekomst ( $R^2=-55,5$  %;  $p<0,001$ ). Sjukdomsförekomsten var positivt korrelerad med glukoskoncentrationen i utsädet ( $R^2=42,2$  %;  $p<0,001$ ). Det fanns även en trend mot en direkt interaktion mellan uppkomst och glukoskoncentration. Pearson-korrelationen var dock inte statistiskt signifikant. Kvoten mellan myo-inositol och glukos bör ha den starkaste interaktionen för både skjutkraft ( $R^2=-30,4$  %;  $p=0,005$ ) och sjukdomsförekomst ( $R^2=-57,8$  %;  $p<0,001$ ) (Tabell 2, Figur 5). Skärningspunkten mellan glukos och myo-inositol föll samman med skjutkraftens optimum, vid behandlingsintensitet 5. Kurvförloppet för skjutkraft kunde beskrivas genom en polynomial ekvation ( $R^2=99,95\%$ ) (Figur 6).



Figur 5. Interaktioner mellan sjukdomsförekomst och skjutkraft av samt koncentration av myo-inositol i värmebehandlade höstvetefrö. Utsädet hade värmebehandlats vid fyra intensiteter (röd = intensitet 3, grön = intensitet 5, violet = 6, grå = 7) eller inte värmebehandlats alls (blå). Cirkelnas diameter indikerar koncentration av myo-inositol.



Figur 6. Samspel mellan koncentrationen av myo-inositol och glukos i höstvetefrö samt utsädet skjutkraft i relation till värmebehandlingens intensitet. Ekvationen beskriver det polynomiala förloppet av trendlinjen för skjutkraft samt dess sannolikhet.

Tabell 2: Pearson korrelation mellan skjutkraft respektive sjukdomsförekomst av värmebehandlat utsäde av höstvetete med hänsyn till valda kolhydrater och organiska syror.  $P < 0,05$ . Enbart korrelationer med  $p < 0,05$  visas.

		Sjukdoms- förekomst	Äppelsyra	Citronsyra	Myo-inositol	Fruktos	Glukos	Sorbitol	Maltos	Kvot myo- inositol/citronsyra	Kvot myo- inositol/glukos	Normal. Kvot myo- inositol/glukos
Skjutkraft	R <sup>2</sup>	0,220	-0,294	-	-0,310	-	-	-	0,299	-0,213	-0,304	-0,372
	P	0,043	0,006	-	0,004	-	-	-	0,005	0,05	0,005	<0,001
Sjukdoms- förekomst	R <sup>2</sup>		-	0,5	-0,555	0,235	0,422	0,339	0,318	-0,365	-0,578	-0,496
	P		-	<0,001	<0,001	0,030	<0,001	0,002	0,003	0,001	<0,001	<0,001

## Metagenom

Analys av metagenomet omfattade sammansättning av bakterie- och svampsamhällen i relation till förbehandling och intensitet av värmebehandling samt utsådens skjutkraft och sjukdomsförekomst. Målet var

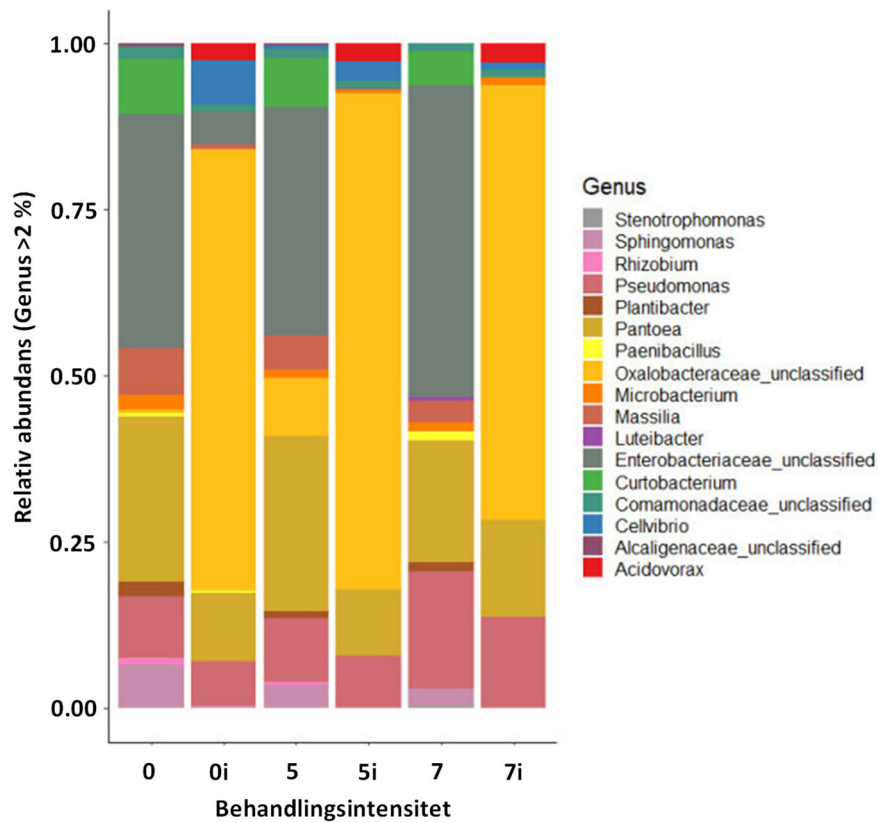
- Att utveckla en DNA baserad metod för att detektera livskraftiga, sjukdomsframkallande organismer av betydelse för fröets skjutkraft
- Att identifiera "keystone" species (d.v.s. arter med avgörande roll att skapa funktionella mikrobiella nätverk) med betydelse för fröets skjutkraft.

### 2.2.5 Effekt av för- och värmebehandling på mikrobiella samhällen på fröskalet och i fröet (malda prover)

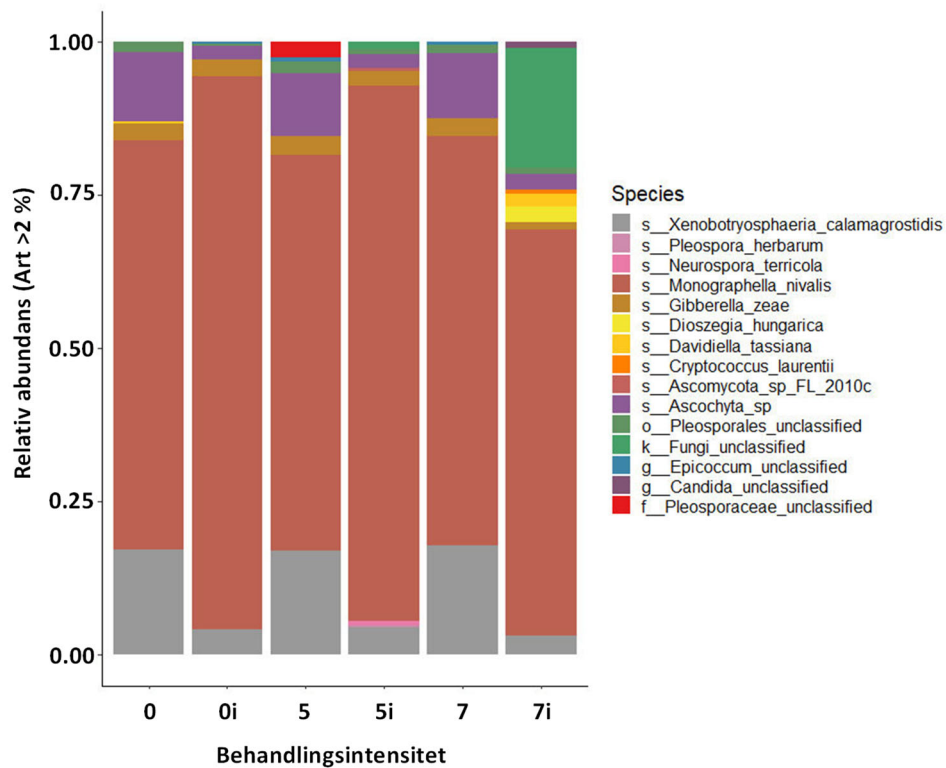
#### *Relativ abundans*

Analysen utgick ifrån malda prover. Vårt dataset omfattade alltså mikroorganismer som koloniserar både fröskalet (epifytisk) och fröets inre (endofytisk). Analys av metagenomet genomfördes från phylum till släkte (bakterier) resp. art (svampar). Grupper > 2% beaktades vid analys av den relativa abundansen. Ingen effekt av värmebehandling kunde konstateras på den relativa förekomsten av varken bakterier eller svampar. Blötläggning av frön före behandling påverkade den relativa förekomsten av bakterier jämfört med frön som inte blötlagts. Med hänsyn till relativ abundans dominerade Proteobacteria i både blötlagda och icke-blötlagda prover på phylum-nivå, men den relativa förekomsten inom phylumet Actinomyceta visade en reducerad förekomst av Actinobacteria i blötlagda prover. Effekten av förbehandling kvarstod på både familj- och –släktnivå gällande bakterier. På familjenivå dominerades den relativa förekomsten av Oxalobacteraceae i blötlagda prover men i ej blötlagda prover var den dominerande taxan Enterobacteriaceae. På släktnivå skedde en förändring i den relativa förekomsten av *Pantoea*, *Pseudomonas* och *Curtobacterium*. Deras relativa förekomst minskade i blötlagda prover (Figur 7).

Vad gäller svampar dominerades svampsamhället i samtliga behandlingar av phylum Ascomycota, familjen Xylariales och släktet Monographella. Blötläggning ledde till en relativ minskning av Pleosporales, medan Xenobotryosphaeria och Ascochyta förekommer mer frekvent i icke-blötlagda prover. På artnivå var den dominerande taxan *Monographella nivales* i alla behandlingar; *Xenobotryosphaeria calmagrostidis* och *Ascomycota* spp. förekom i mindre utsträckning i blötlagda prover (Figur 8).



Figur 7. Relativ abundans av bakteriesläkten i malda höstvetefrö. i=imbiberad (blötlagd).



Figur 8. Relativ abundans av svamparter i malda höstvetefrö. i=imbiberad (blötlagd).

### *Diversitet*

Taxonomisk diversitet kan uttryckas i form av alfa- och betadiversitet. Alfadiversitet beskriver samhällets artrikedom och diversitet på provnivå. Två indikatorer är vanligt använda för beskrivning av alfadiversitet, nämligen Shannon H-index (artrikedom samt hur jämnt arterna är fördelade) och Chao1-index (artrikedom). Betadiversitet karakteriserar diversitet på en överordnad nivå, i föreliggande fall mellan behandlingarna. Föreliggande dataset grupperades med hänsyn till behandlingsintensitet och förbehandling (blötläggning). Prover som inte hade utsatts för värmebehandling och inte var blötlagda användes som kontroll.

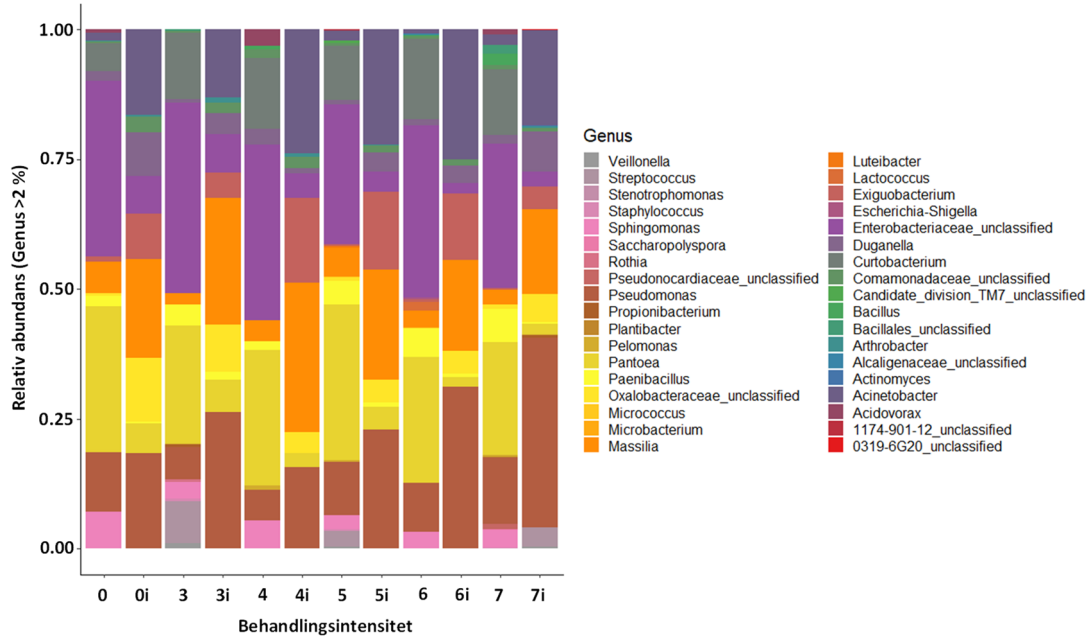
För bakterier visade Shannon index en signifikant skillnad mellan kontrollen och de blötlagda frön som utsatts för måttliga eller höga behandlingsintensiteter ( $p < 0,01$ , tabell 2). Artrikedomen (Chao1) visade att antalet arter i blötlagda frön i alla värmebehandlingar ökade signifikant ( $p < 0,01$ ) jämfört med icke blötlagda. För svampar visade Shannon-index en signifikant skillnad mellan kontrollen och de blötlagda proverna med samtliga värmebehandlingarna ( $p < 0,01$ , tabell 2), men det fanns ingen signifikant inverkan på svampsamhällets artrikedom (Chao1). Betadiversitetsmått för bakterie- och svampsamhällen visade ingen tydlig skillnad mellan värmebehandlingarna, men bakteriesamhället grupperades med avseende på förbehandling, vilket inte sågs i svampsamhället.

## 2.2.6 Effekt av för- och värmebehandling på mikrobiella samhällen på fröskalet

### *Relativ abundans*

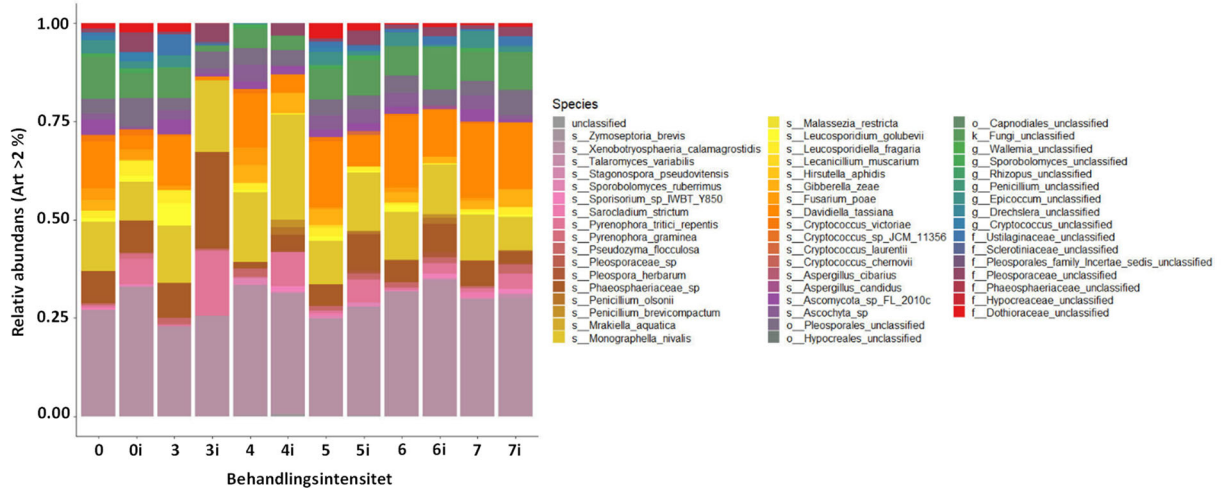
Mikrobiella samhällen extraherade från hela frön återspeglar de samhällen som koloniserar fröskalet. Prover från enbart fröskalet (*epifytisk*) visade samma mönster som i data från malda prover; nämligen att värmebehandling inte signifikant påverkade det mikrobiella samhällets struktur, då taxa som var vanligare än 2% beaktades. På phylumnivå observerades tre phyla, där dominerande phylum var Proteobacteria, oavsett förbehandling, följt av Firmicutes och Actinobacteria. De sistnämnda minskade signifikant i förekomst i de blötlagda proverna. Också på familjenivå fanns det skillnader utifrån förbehandlingen. Den relativa förekomsten av både Oxalobacteraceae och Moraxellaceae minskade i de icke-blötlagda proverna. Enterobacteriaceae hade högre relativ abundans i de icke-blötlagda än i de blötlagda proverna. Blötläggning ledde till en ökad relativ abundans av släktena *Pseudomonas*, *Microbacterium* och *Actinobacter*, till skillnad från släktena *Pantoea* och *Curtobacterium* som dominerade icke-blötlagda prover. Förekomsten av familjen Enterobacteriaceae minskade relativt sett till följd av blötläggning (Figur 9).





Figur 9. Relativ abundans av bakterier på släktnivå extraherade från hela höstvetefrö. Bakterierarter som var vanligare än 2 % beaktades. *i*=imbiberad (blötlagd).

Den relativa svampförekomsten på phylumnivå visade ingen skillnad mellan intensitet av värmebehandling eller blötläggning. Det dominerande phylum i alla behandlingar var Ascomycota. På familjenivå påverkade intensiteten av värmebehandlingen den relativa förekomsten av Davidiaceae som ökade med stigande intensitet. Familjer inom ordningen Pleosporales dominerade. De dominerande släktena var i alla behandlingar *Xenobotryosphaeria* spp., *Monographella* spp. och *Davidella* spp.. Den relativa förekomsten av ett antal växtpatogener översteg 2 %, bland dessa *Parastagnospora pseudovitensis*, *Monographella nivalis* och *Fusarium poae* (Figur 10).



Figur 10. Relativ abundans av svamparter extraherade från hela höstvetefrön. Arter som var vanligare än 2 % beaktades. i=imbiberad (blötlagd).

### Diversitet

Ingen inverkan av värmebehandlingsintensitet eller blötläggning konstaterades med hänsyn till alfadiversitet (Shannon och Chao 1 index) av höstvetefrön i varken bakterie- och svampsamhällen. Betadiversitet för bakteriesamhällen skiljde sig inte åt mellan värmebehandlingsintensiteterna men grupperades med avseende på blötläggning. Betadiversitet för svampsamhället skiljde varken mellan värmebehandlingsintensiteter eller förbehandling.

### ddPCR

ddPCR användes för att uppskatta förekomsten av *Fusarium* spp. och *Microdochium* spp. på höstvetefrön efter värmebehandling. Denna analys utgick ifrån komplementär DNA (cDNA), d.v.s. syntetiserat från enkelsträngad RNA (t.ex. mRNA). Resultaten är på så sätt ett mått på levande organismer. Trots värmebehandling var dessa patogener fortfarande närvarande på fröna. Det fanns ingen skillnad mellan blötlagda och icke-blötlagda prover.

### 3. Diskussion och slutsatser

Termisk behandling av utsäde har visat sig minska sjukdomsförekomst (Gilbert et al., 2005). Enligt Gilbert et al. (2005) var värmebehandling av vetefrö vid 30 °C och 50 °C verkningslös för att motverka förekomst av *Fusarium graminearum*, medan behandling vid 90 °C avdödade både patogenen och fröet. Värmebehandling vid 70 °C ledde däremot till en mycket låg förekomst av *Fusarium*, samtidigt som vetets uppkomst gynnades. I föreliggande rapport redovisar vi behandlingen i form av behandlingsintensitet. Föreliggande arbete stödjer den av Gilbert et al. (2005) beskrivna trend.

Behandlingsintensiteten modifierade koncentrationen av vissa sockerarter (myo-inositol, raffinosa, sorbitol, glukos) och organiska syror (citronsyra). Myo-inositol är en metabolit som är viktig för växters utveckling och tillväxt (Loewus and Murthy, 2000). Det är också viktigt för lagring av auxin, bildning av cellväggar, syntes av fytinsyra och oligosackarider såsom raffinosa (Sharma et al., 2020). Oligosackarider tillhörande raffinosa familjen anses spela en viktig roll för utsädes växtkraft och reglerar frögroningen (Bewley et al., 2013; Panikulangara et al., 2004; Salvi et al., 2022). Raffinosa är känt för sin skyddsfunktion mot abiotisk stress, såsom uttorkning av frön (Sengupta et al., 2015), men denna oligosackarid har också identifierats i blad av värmestressade plantor (*Arabidopsis*) (Panikulangara et al. 2004). Detta skulle kunna förklara den stigande raffinosa koncentrationen i frö med ökande behandlingsintensitet. Glukos stimulerar tidig frötutveckling och förbrukas under tiden i olika metaboliska processer (Wang et al., 2018).

Det kan tyckas förvånande att samma förhållande endast förklarar 37 % av variansen i skjutkraft. Men låg skjutkraft förekommer då frö inte värmebehandlats och när behandlingsintensiteten varit för kraftig. Däremot sammanföll skärningspunkten för koncentrationen av myo-inositol och glukos vid olika behandlingsintensiteter av höstvetefrö med skjutkraftsoptimum. Detta är ett unikt resultat. Det tyder på att dessa två ämnen kan vara intressanta i uppföljningsstudier som prediktorer för skjutkraft. Denna studie visar att förhållandet mellan myo-inositol och glukos kan vara en kandidat för bestämning av sjukdomsförekomst och uppkomst efter värmebehandling och därmed vara en indikator för att ställa in rätt värmebehandlingsintensitet i enskilda partier av höstveteutsäde. Korrelationskoefficienterna är dock inte alltid övertygande, vilket delvis förklaras med förhållandevis stora avvikelser inom behandlingarna. För att validera och vidare utse en prediktor måste därför fönstret för behandlingsintensiteter minskas och intensiteter mellan 4,0-6,5 med hjälp av ThermoSeed®-skalan övervägas.

Den normaliserade kvoten mellan myo-inositol och glukos förklarade variansen i sjukdomsangrepp efter värmebehandling till ca 50 %. Förekomsten av endofytiska patogener skulle kunna vara en förklarande faktor för den återstående variansen. Värmebehandling med Thermoseed® påverkar de epifytiska organismerna medan endofytiska organismer förblev livskraftiga (Bänzinger et al., 2022). Detta skulle också förklara överensstämmelsen mellan metagenomanalys utförda på malda prover resp. hela frön. Utifrån cDNA-analys i den här studien dominerade *Fusarium* spp. och *Microdochium* spp. efter behandlingen, och förekomsten av *Microdochium nivale* var mycket högt jämfört med de andra svamparna.

Däremot kunde ingen avgörande grupp av mikroorganismer kopplas till värmebehandlingsintensiteten. I vår studie extraherades DNA som användes för metagenomik från fröskal och från malda frön av höstvetete. Sådana data omfattar DNA från både döda och levande organismer. För att visa en signifikant förändring i samhällets sammansättning måste behandlingseffekten överstiga bakgrundsbruset av DNA från döda organismer. Värmebehandling ger inte sådana direkta bieffekter. För att identifiera en specifik organism eller grupp av organismer som förutsäger skjutkraft måste man därför använda RNA-baserade metoder snarare än DNA-metoder.

Blötläggning påverkar groningen och uppkomsten. Den här studien visar också att förbehandlingen (blötläggning) av fröet före analys är avgörande för både metabolom och metagenom. Detta är förväntat eftersom blötläggning initierar groningsprocesser (respiration, tillväxt, mobilisering av inlagrade organiska föreningar) och samtidigt ger de vatten- och näringsmässiga förutsättningarna för uppförökning av mikroorganismer (Figur 2) (Nelson, 2004; Windstam and Nelson, 2008). Detta förklarar avsaknaden av skillnader i metaboliskt avgörande föreningar i icke-blötlagda prover, men också förändringar i diversitet och rikedom av bakterie- och svamparter efter blötläggning. Mikroorganismer som koloniserar frön skiljer sig åt i sin förmåga och hastighet att nyttja organiska föreningar som frigörs under groning, vilket leder till förändringar i det mikrobiella samhällets sammansättning. Det faktum att förekomsten av infektioner var jämförbar i blötlagda och icke-blötlagda frön innebär att de sjukdomsalstrarna som orsakar symptom på groddarna inte konkurrerades ut av en ökad diversitet och artrikedom.

Sammanfattningsvis konkluderar vi att

- Att sambandet mellan glukos och myo-inositol kan vara kandidater för prognos av skjutkraft i höstvetete
- Att metagenomanalys baserad på DNA extraktion inte resulterade i att identifiera några "keystone"-organismer eller grupper av organismer som kan förutsäga höstvetetes skjutkraft efter värmebehandling, och
- Att vissa sjukdomsalstrare som förväntades avdödas genom värmebehandling detekterades efter värmebehandlingssteget med hjälp av cDNA baserad analys. Ytterligare undersökningar behövs för att kunna dra slutsatser om resultatets betydelse för svamparnas virulens i fält.

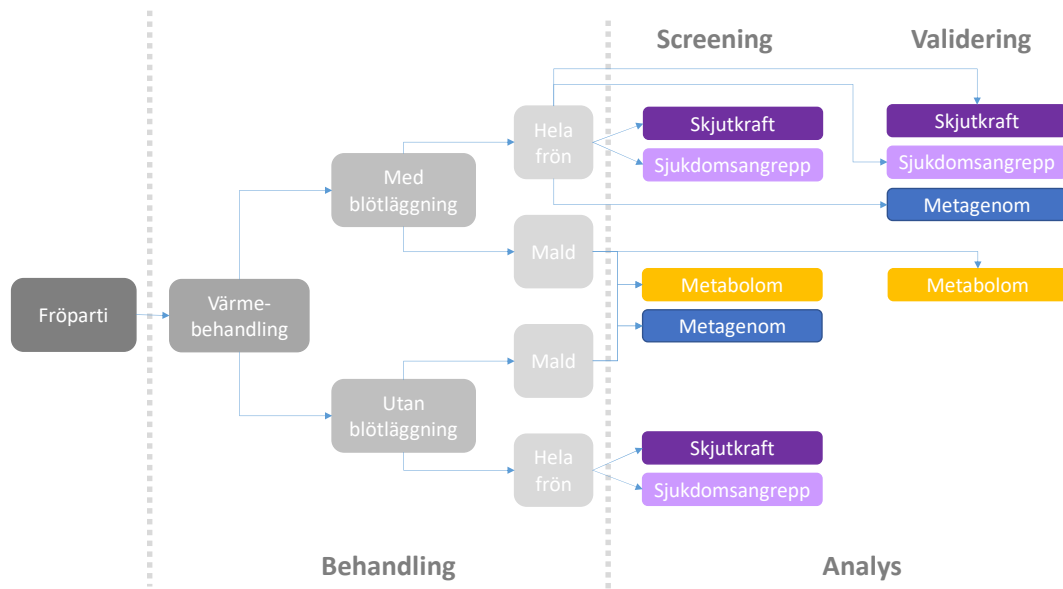
Utifrån de framtagna resultaten och erfarenheter rekommenderar vi

- Att finjustera intensitetsstegen inför validering av nyckelsubstanser som kan ge en prognos på skjutkraften samt att finjustera längd av imbibering och tidsintervall till analys
- Att använda ett snävare behandlingsintensitetsfönster (4-6,5) för modellering av nyckelsubstanser i relation till skjutkraft
- Att för en framtida modellering använda myo-inositol och glukos som potentiella prediktorer samt raffinosa som tröskelvärde
- Att DNA-baserade metoder för identifiering av nyckelorganismer /nyckelgrupper av organismer inte är ändamålsenliga utan att användning av RNA-baserade metoder bör övervägas
- Olika lagringsbetingelser och –längd är ett bekymmer för analyser.

## 4. Material och metoder

### 4.1 Utsäde och utsädesbehandling

Utsädespartier av höstvetete (*Triticum aestivum*) med hög förekomst av blandade sjukdomar orsakade av svampangrepp valdes från olika kommersiella platser i Sverige för detta två-faktoriella försök, med faktor 1: behandlingsintensitet och faktor 2: förbehandling (med eller utan blötläggning). Tre till fem värmebehandlingsintensiteter valdes för undersökningen (0, 3, 5, 6, och 7). Undersökningen genomfördes i två steg, nämligen screening med 36 prover och validering med 170 prover. Bortsett ifrån biotesterna genomfördes samtliga analyser under screening på malda prover. Vid validering utgick vi också från hela frön för analys av mikrobiella samhällen, medan malda prover användes för metabolomanalys (Figur 11).



Figur 11. Flödesschema över förbehandlingar och analyser

## 4.2 Biotester

Skjutkraftstestet utfördes på följande sätt: 1 kg frön rengjordes i en provrengörare (MLN-modell från Perten) för att avlägsna skräp och damm och för att få ett prov med enhetlig fröstorlek. Provet delades sedan upp och behandlades enligt samma villkor som nämns ovan. Efter värmebehandling såddes proverna i jord på ett djup av 3 cm, med 50 frö per replikat och tre replikat per behandling, i genomskinliga plastkrukor (185 x 125 x 75 mm) med 2 hål i botten för enkel och jämn bevattning. Krukorna randomiserades på en bricka och täcktes med ett lock för att förhindra avdunstning. Brickan placerades vid 6 °C i mörkret i 10 dagars kall inkubation och flyttades sedan till en 20 °C kammare under 3 uppsättningar polykromatiska LED-lampor i 24 h. Locket avlägsnades och krukorna vattnades från botten med 5 L kranvatten. Efter fem dagar utvärderades planthöjd och antal uppkomna växter. Sju dagar senare avlägsnades det översta jordlagret och infektionsstatus bedömdes för varje planta utifrån koleoptilens utseende: koleoptiler som visade bruna skador ansågs vara sjuka medan vita/gröna koleoptiler ansågs vara friska.

## 4.3 Mikrobiell analys

### 4.3.1 DNA extraction

DNA-extraktion utfördes med Zymobiomics DNA miniprep Kit (Zymo research) enligt tillverkarens protokoll. I screeningssteget användes för varje prov 100 mg malda höstvetefrön (totalt 36 prover). I valideringssteget utgick vi ifrån 10 g hela höstvetefrön (170 prover, 10 prover från 17 olika partier). Materialet placerades i 50 ml falconrör och kompletterades med 10 ml PBS. Rören skakades i 4 h innan de centrifugerades vid 5000 rpm i 10 min. Supernatanten kasserades och pelleten suspenderades i 750 µl RNA/DNA-sköld (zyzo). DNA och RNA extraherades med Zymobiomics DNA/RNA miniprep Kit (Zymo research) i enlighet med tillverkarens protokoll.

### 4.3.2 droplet digital PCR (ddPCR)

*F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminaceum*, *M. nivale* och *M. nivale majus* kvantifierades med hjälp av det automatiserade QX200™ Droplet Digital™ PCR-systemet (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). En reaktionsblandning beredd bestående av 10 µl QX200 EvaGreen Digital PCR Supermix, 0,5 µl framåtriktade och omvända artspecifika primrar, 7 µl DNase/RNase-fritt MilliQ-vatten och slutligen 2 µl DNA-prov till en slutlig volym på 20 µl. Proverna gick genom ddPCR analyspipeline bestående av

droppgenerering, försegling, PCR och slutligen dropläsning<sup>1</sup>. Programvaran QuantaSoft™ användes för att köra instrumentet och analysera data.

### 4.3.3 Illumina sequencing Metagenomics

Illumina MiSeq gjordes via LGC Genomics GmbH (Berlin, Tyskland). Bakteriella samhällen togs fram med hjälp av 16S forward primer 799F (5'-AACMGGATTAGATACCCCKG-3') (Chelius and Triplett, 2001) och reverse primer 1115R (5'-AGGGTTGCGCTCGTTRC-3') (Reysenbach and Pace, 1995). Svampsamhällen detekterades med ITS forward primer ITS1F\_Kyo2 (5'-TAGAGGAAGTAAAAGTCGTA-3') (Bokulich and Mills, 2013) och reverse primer (5'-TTCAAAGATTTCGATGATTCAG-3') (Vancov and Keen, 2009). Den övergripande bioinformatiska bearbetningen (inkl. kvalitetskontroll) utfördes av LGC Genomics GmbH (Berlin Germany). Enbart sekvenser med en längd >100 baser beaktades.<sup>2</sup>

## 4.4 Metabolomanalys

Metabolomanalysen utfördes vid Svenskt Metabolomiskt Centrum (SMC) i Umeå. Proverna behandlades enligt vad som nämnts ovan. Fröna maldes två gånger och skickades till SMC där proverna frystorkades för att kompensera för eventuella skillnader i vattenhalt före metabolitextraktion. Metabolitextraktion utfördes enligt Gullberg et al. (2004)<sup>3</sup>.

## 4.5 Statistisk analys

All statistisk analys utfördes i R studio ([www.rstudio.com](http://www.rstudio.com)) resp. Minitab vers 20. För att uppskatta förändringar i det mikrobiella samhället vid olika värmebehandlingar användes Shannon och Chao1 för att uppskatta alfadiversitet med hjälp av paketet phyloseq (McMurdie and Holmes, 2013). Betadiversiteten beräknades med hjälp av viktad UniFrac i distans- och ordinatfunktionen i Phyloseq-paketet.

För GC-MS-data exporterades alla icke-processade MS-filer från den metaboliska analysen från ChromaTOF-programvaran i NetCDF-format till MATLAB R2020a (Mathworks, Natick, MA, USA), där alla förbehandlingar av data, såsom baslinjekorrigerings, kromatogramjustering, datakomprimering och Multivariate Curve Resolution, utfördes. De extraherade masspektren identifierades genom jämförelser av deras retentionsindex och masspektra med bibliotek av retentionstidsindex och

---

<sup>1</sup> Detaljerad information om behandlingsparametrarna kan rekvireras från medförfattarna till denna rapport som är anställda vid SLU.

<sup>2</sup> Detaljerad information om tillvägagångssättet vid metabiomanalysen, kan rekvireras av medförfattarna till denna rapport som är anställda vid SLU.

<sup>3</sup> Detaljerad information om tillvägagångssättet vid metabolomanalysen, inkl analysparametrar för LC-MS och GC-MS kan rekvireras av medförfattarna till denna rapport som är anställda vid SLU.



masspektra (Schauer et al., 2005). Jämförelse av masspektra och retentionsindex utfördes med programvaran NIST MS 2.2. Annoteringen av masspektra baserades på omvända och framåtriktade sökningar i biblioteket. Masspektrat med högst sannolikhet som indikerar en metabolit och retentionsindex mellan provet och biblioteket för den föreslagna metaboliten var  $\pm 5$  (vanligtvis mindre än 3) den dekonvoluterade "toppen" annoterades som en identifiering av en metabolit.

För LC-MS-data utfördes all databehandling med Agilent Masshunter Profinder version B.10.00 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA).

# Referenser

- Adam, E., Bernhart, M., Muller, H., Winkler, J., and Berg, G. (2018). The Cucurbita pepo seed microbiome: genotype-specific composition and implications for breeding. *Plant and Soil* 422, 35-49. doi: 10.1007/s11104-016-3113-9.
- Alsanius, B.W., and Wohanka, W. (2019). Root zone biology of soilless cropping systems. In *Soilless cropping systems*, M. Raviv, and H.-J. Lieth, eds. (Amsterdam: Elsevier), pp. 149-194. doi: 10.1016/B978-0-444-63696-6.00005-0.
- Bänzinger, I., Kägi, A., Vogelgsang, S., Klaus, S., Hebeisen, T., Büttner-Mainik, A., and Sullam, K.E. (2022). Comparison of thermal seed treatments to control snow mould in wheat and loose smut of barley. *Front Agron* 3, 775243. doi: 10.3389/fagro.2021.775243cd.
- Bergna, A., Cernava, T., Zachow, C., and Berg, G. (2019). Analysing seed endophytes for biotechnology.
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M., and Nonogaki, H. (2013). *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*, 3 edn (New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Springer).
- Bokulich, N.A., and Mills, D.A. (2013). Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities. *Appl Environ Microbiol* 79, 2519–2526. doi: 10.1128/AEM.03870-12.
- Chelius, M., and Triplett, E. (2001). The diversity of archea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microb Ecol* 41, 252-263. doi: 10.1007/s002480000087.
- Fuernkranz, M., Lukesch, B., Mueller, H., Huss, H., Grube, M., and Berg, G. (2012). Microbial Diversity Inside Pumpkins: Microhabitat-Specific Communities Display a High Antagonistic Potential Against Phytopathogens. *Microbial Ecology* 63, 418-428. doi: 10.1007/s00248-011-9942-4.
- Gilbert, J., Woods, S.M., Turkington, T.K., and Tekauz, A. (2005). Effect of heat treatment to control *Fusarium graminearum* in wheat seed. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27, 448-452. doi: 10.1080/07060660509507244.
- Gullberg, J., Jönsson, P., Nordström, A., Sjöström, M., and Moritz, T. (2004). Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 331, 283-295. doi: 10.1016/j.ab.2004.04.037.
- Loewus, F., and Murthy, P. (2000). Myo-inositol metabolism in plants. *Plant Sci* 150, 1-19. doi: 10.1016/S0168-9452(99)00150-8.

- Matsumoto, H., Fan, X., Wang, Y., Kusstatscher, P., Duan, J., Wu, S., Chen, S., Qiao, K., Wang, Y., Ma, B., *et al.* (2021). Bacterial seed endophyte shapes disease resistance in rice. *Nature Plants* 7. doi: 10.1038/s41477-020-00826-5.
- McMurdie, P.J., and Holmes, S. (2013). Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8, e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217.
- Nelson, E.B. (2004). Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annual Review in Phytopathology* 42, 271-309. doi: 10.1146/annurev.phyto.42.121603.131041.
- Panikulangara, T.J., Eggers-Schumacher, G., Wunderlich, M., Stransky, H., and Schöffl, F. (2004). Galactinol synthase1. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in Arabidopsis. *Plant Physiology* 136, 3148-3158.
- Reysenbach, A., and Pace, N. (1995). Reliable amplification of hyperthermophilic archeal 16S rRNA genes by the polymerase chain reaction. In *Archea: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, ), pp. 101-107.
- Salvi, P., Varshney, V., and Majee, M. (2022). Raffinose family oligosaccharides (RFOs): role in seed vigor and longevity. *Bioscience Reports* 42, BSR20220198. doi: 10.1042/BSR20220198.
- Schauer, N., Steinhauser, D., Strelkov, S., Schomburg, D., Allison, G., Moritz, T., Lundgren, K., Roessner-Tunali, U., Forbes, M.G., Willmitzer, L., *et al.* (2005). GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Lett* 579, 1332-1337. doi: 10.1016/j.febslet.2005.01.029.
- Sengupta, S., Mukherjee, S., Basak, P., and Majumder, A.L. (2015). Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Front Plant Sci* 6, 656. doi: 10.3389/fpls.2015.00656.
- Sharma, N., Chaudhary, C., and Khurana, P. (2020). Wheat Myo-inositol phosphate synthase influence plant growth and stress responses via ethylene mediated signalling. *Sci Rep* 10, 10766. doi: 10.1038/s41598-020-67627-w.
- Vancov, T., and Keen, B. (2009). Amplification of soil fungal community DNA using the ITS86F and ITS4 primers. *FEMS Microbiology Letters* 296, 91-96. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01621.x.
- Wang, L., Patrick, J.W., and Ruan, L.-Y. (2018). Live long and prosper: Roles of sugar and sugar polymers in seed vigor. *Molecular Plant* 11, 1-3. doi: 10.1016/j.molp.2017.12.012.
- Wassermann, B., Abdelfattah, A., Wicaksono, W.A., Kusstatscher, P., Mueller, H., Cernava, T., Goertz, S., Rietz, S., Abbadi, A., and Berg, G. (2022). The Brassica napus seed microbiota is cultivar-specific and transmitted via paternal breeding lines. *Microbial Biotechnology*. doi: 10.1111/1751-7915.14077.
- Windstam, S., and Nelson, E.B. (2008). Temporal release of fatty acids and sugars in the spermosphere: Impacts on *Enterobacter cloacae*-induced biological control. *Appl Environm Microbiol* 74, 4292-4299. doi: 10.1128/AEM.00264-08.

# Tack

Detta projekt genomfördes som tandemprojekt och finansierades av Lantmännens forskningsstiftelse (projektnummer: 2019H052) och av Partnerskap Alnarp i samarbete med BioagriAB (projektnummer: PA1279).