

# Bekämpning med "naturliga fungicider" mot lagringssjukdomar – Förstudie

*Protection against storage decay by natural fungicides*

**Ibrahim Tahir**

Institutionen för växtförädling, Alnarp

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för landskapsarkitektur, trädgårds- och växtproduktionsvetenskap

**Rapport 2014:6**

ISBN 978-91-87117-67-1

Alnarp 2014





**LANDSKAPSARKITEKTUR**  
**TRÄDGÅRD VÄXTPRODUKTIONSVETENSKAP**  
Rapportserie

# Bekämpning med "naturliga fungicider" mot lagringssjukdomar – Förstudie

*Protection against storage decay by natural fungicides*

**Ibrahim Tahir**

Institutionen för växtförädling, Alnarp

Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för landskapsarkitektur, trädgårds- och växtproduktionsvetenskap

**Rapport 2014:6**  
ISBN 978-91-87117-67-1  
Alnarp 2014



## Sammanfattning

Lagersjukdomar orsakade av olika svamparter är en av de viktigaste anledningarna till att äppelodlingar har ett betydligt större bortfall av försäljningsbar frukt. Detta beror på att det inte är tillåtet att behandla frukt med fungicider efter skörd och antalet tillåtna fungicider, för användning före skörd, har minskat. Målsättningen för detta projekt har varit att undersöka om man kan utveckla ett biologiskt preparat med bioaktiva ämnen för att motverka svamp. Ett antal försök utfördes för att undersöka hämningseffekten från fyra olika bioaktiva ämnen på svampangrepp i äpplen (*In vivo*) och på tillväxten av två patogener (*Penicillium expansum* och *Neofabraea sp.*) (*In vitro*). Behandlingarna minskade tillväxten av mycelium för båda patogener. Citral, eugenol och thymol-lösningar hade högre hämningseffekt än mentol-lösning. Behandlingar med bioaktiva ämnen gav olika grader av skydd mot svampangreppen som orsakades av inokulering frukt med båda patogener. Thymol hade den bästa effekten.

## Abstract

The Swedish fruit production is facing major problems with the profitability partly because of a significant amount fruits spoiled due to pathogens, developing during storage. It is not allowed to treat the fruit with fungicides after harvest while in recent years the number of allowed pre-harvest fungicides has decreased, and further limitations of fungicides are expected in the Baltic Sea region, where the most of the Swedish commercial fruit orchards is situated. Since pre- and post-harvest application of fungicides is totally prohibited in the organic production, problems with storage diseases become even more severe. Therefore it is necessary to develop new alternative and environmental friendly treatments, so called natural fungicides.

A number of experiments were achieved to investigate inhibition effect of different bioactive compounds (Citral, Thymol, Eugenol and Menthone) on fungal decay in apples, caused by *Penicillium expansum* and *Neofabraea sp.*, (*in vivo*) and on the growth of their mycelium (*in vitro*). The treatments decreased the growth of the mycelium of both pathogens. Citral, eugenol and thymol showed greater inhibition effect than menthone. Treatments with these four bioactive compounds gave various degrees of protection against fungus in inoculated apples with the two pathogens. Thymol had the best effect.

## Bakgrund

I Europa har svampsjukdomar ökat betydligt under de senaste decennierna, sannolikt på grund av den globala uppvärmningen (Amiri et al. 2008; Weber och Roland 2009). Dessa skador är en av de väsentliga anledningarna till att den svenska fruktproduktionen står för allvarliga ekonomiska problem (Jönsson och Nybom 2008, Tahir och Nybom 2008, Jönsson et al. 2010). Därför kan vi förvänta oss allt större problem i Sverige medan klimatet här blir varmare och eventuellt också mer fuktigt under vegetationsperioden.

Lagersjukdomen som tidigare kallades gloeosporiumröta är den farligaste svampen som orsakar de största förlusterna hos Svenska äpplen (Tahir, 2006). Nyligen visade en studie att det mesta av gloeosporiumrötan kan orsakas av en av de tre viktigaste svamparterna; *Neofabrea perennans*, *Neofabrea alba* eller *Neofabraea malicorticis* (Spotts, et al. 2009). Dessa svamparter angriper frukten redan i odlingen och orsakar små döda fläckar på skalet som sprider sig in i frukten under fuktigt väder. Sporerne ligger latent i lenticellerna eller som sår på skalet innan de börja växa när frukten har nått en viss mognadsfas i lagret. Fruktar är mest mottagliga för angreppet strax efter blomning och känsligheten minskar under sommaren för att åter öka något, närmare skörden. Om blommorna infekteras kan sjukdomen utvecklas under odlingssäsongen men smittan kan också ligga latent och utvecklas först när frukten ligger i lagret (Mari et al. 2002; Weibel et al. 2005). Grönmögel går även under benämningen mjuk röta och orsakas av svampen *Penicillium expansum*, som vanligtvis uppträder i slutet av lagringen. Angripna fläckar på frukten får en grön-blå färg, därefter blir rötorna på röda frukter ljusbruna och gula frukter får grön-brun till mörkgul röta. När det infekterade området börjar bli mjukt så utvecklas rötan snabbt och hela frukten blir förstörd. Under fuktiga förhållanden bildas massor av blågröna konidier på fruktskalet. Sporerne hos denna mycket aggressiva svampsjukdom sprids via luften.



*Neofabraea* sp.

*Colletotrichum acutatum*

*Monilia* sp.

*Penicillium expansum*

I Sverige är det inte tillåtet att behandla frukten med fungicider efter skörd. Nyligen, har antalet tillåtna fungicider för användning före skörd även minskat, och ytterligare begränsningar väntas för vattenskyddsområden i stora delar av Österlen där de flesta av de kommersiella svenska fruktodlingarna ligger. Därutöver har Jordbruksverket, i enlighet med EUs direktiv, beslutit att alla odlare i landet ska, före år 2014, antingen tillämpa principerna för integrerat växtskydd eller odla enligt principerna för ekologisk produktion. Således kan, nya alternativa och miljövänliga behandlingar (så kallade "naturliga" fungicider), kraftigt minska efterskördeförlusten och öka lönsamheten för den enskilda odlaren och därmed stärka svensk frukts konkurrenskraft på marknaden.

Några bioaktiva föreningar kan hämma tillväxten av svamp hos äpple och päron (Tsao och Zhou 2000, Plotto et al. 2003, Mari et al. 2002, 2008, Neri et al. 2006, 2007, 2009). De flesta växtoljor, från kryddor och örter, som ofta används i vår dagliga kost kan också hämma

svampangrepp. Eugenol är den mest aktiva komponenten mot *B. cinerea*, *M. fructigena*, *P. expansum*, och *P. vagabunda* hos äpple. Tillämpningen av eugenol preparerad med uppvärmt lecitin kan bli ett framgångsrikt alternativ till de traditionella fungicider som används i äppleodlingar (Ameri, et al. 2008). Trans- anethole, Carvacrol och Citral, har även hämrat tillväxten av *gloeosporium*, *Neofabraea alba*, i äpplen (Neri et al. 2006), liksom Chitosan och etanol (Romanazzi et al. 2007).

Projektet syftar till att utveckla en effektiv, miljövänlig och kostnadseffektiv bekämpningsmetod mot lagringssjukdomar hos olika äpple- och päronsorser. Målet för denna förestudie är att undersöka den hämmande effekten från några växtoljor framtagna från olika kryddor och örter (bl.a. kryddnejlika, timjan och pepparmynta) på svampangrepp (*Penicillium expansum* och *Neofabraea sp.*).

## Material och metod

### 2.1. Försökslokal

Det experimentella arbetet inleddes sommaren-hösten 2013 i SLUs laboratorium och lagringsrum.

### 2.2. Behandlingar

Fyra bioaktiva ämnen Thymol, Mentol, Eugenol och Citral och tre lösningsämnen, Lecitin, Tween 80 samt Etanol köptes från SIGMA ALDRICH (Solkraftsvägen 14C 135 70 Stockholm). Behandlingslösningarna framställdes enligt följande:

- Eugenol-lösning: 2 mg eugenol (99%) upplöstes i ml soja lecitin.
- Soja lecitinlösning: 50 mg/ml soja lecitin upplöstes i lite etanol innan det blandades med steriliserat vatten.
- Mentol-lösning: 1500 µl upplöstes i en liter steriliserat vatten + Tween 80 (5%).
- Tween 80 lösning: en liter steriliserat vatten + Tween 80 (5%).
- Thymol lösning: 30 mg thymol (99,5%) upplöstes i en liter etanol (95%).
- Etanol: 95%.
- Citral lösning: 200 µl upplöstes i en liter etanol (95%).

### 2.3. In vitro undersökning

Patogenerna (*P. expansum* och *Neofabraea sp.*) isolerades från naturligt infekterade äpplen som uppvisade typiska symptom för grönmögel och lagringssjukdomar. *P. expansum* odlades i PDA under två veckor vid 24 °C, rena kolonier lagrades vid 4 °C. *Neofabraea spp* odlades i MEA under tre veckor vid 20 °C, rena kolonier lagrades vid 4 °C. För fruktinokulering togs konidiesporer från *P. expansum* och *Neofabraea spp.* kolonier och suspenderades i 5 ml sterilt destillerat vatten innehållande 0,05% (v/v) Tween 80. Suspensionen filtrerades genom fyra lager av sterilt filterduk och späddes ut till en koncentration av  $1 \times 10^5$  sporer  $\text{mL}^{-1}$  (detta bestämdes med hjälp av en hemacytometer).

Tjugofyra Petri-plattor (90 mm i diameter), som innehåller 10 ml potatisdextrosagar (PDA), framställdes. Efter autoklavering och agar stelning, överfördes en mycelium plugg (10 mm i

diameter) från aktivt växande *P. expansum* kulturer, till mitten av var och en av dessa plattor. Plattorna delades in i 8 grupper, tre block i varje grupp. Efter 3 timmar, behandlades grupperna med olika lösningar enligt tabell 1. Lösningarna lades på filterpapper som fästades på insidan av plattornas lock (bild 1).



**Bild 1. In vitro undersökning**

(P.e= *Penicillium expansum*;  
N. = *Neofabraea sp.*)

Plattorna slöts sedan igen med locken och inkuberades i 24 °C under två veckor. Myceliumstillväxten undersöktes och hämningseffekten från de olika behandlingsämnena bedömdes. Samma procedur upprepades med tjugofyra Petri-plattor (90 mm i diameter), innehållandes 10 ml maltextraktagar (MEA), där mycelium av *Neofabraea sp.* användes som patogen istället för *P. expansum*, och behandlades på samma sätt enligt tabell 1:

**Tabell 1. In vitro behandlingar med olika ämnen**

| Platta nr. | Patogen                                | Behandling     | Behandlingsmetod             |
|------------|--|----------------|------------------------------|
| 1-3        | <i>P. expansum</i><br>i PDA plattor    | Kontroll       | Ingen                        |
| 4-6        |  | Lösningsmedel  | 10 ml av Tween 80-lösning    |
| 7-9        |  | Lösningsmedel  | 10 ml av soja lecitinlösning |
| 10-12      |  | Bioaktivt ämne | 10 ml av Mentollösning       |
| 13-15      |  | Lösningsmedel  | 10 ml etanol                 |
| 16-18      |  | Bioaktivt ämne | 10 ml eugenol-lösning        |
| 19-21      |  | Bioaktivt ämne | 10 ml thymol-lösning         |
| 22-24      |  | Bioaktivt ämne | 10 ml citrl-lösning          |
| 1-3        | <i>Neofabraea sp.</i><br>i MEA plattor | Kontroll       | Ingen                        |
| 4-6        |  | Lösningsmedel  | 10 ml av Tween 80-lösning    |
| 7-9        |  | Lösningsmedel  | 10 ml av soja lecitinlösning |
| 10-12      |  | Bioaktivt ämne | 10 ml av Mentollösning       |
| 13-15      |  | Lösningsmedel  | 10 ml etanol                 |
| 16-18      |  | Bioaktivt ämne | 10 ml eugenol-lösning        |
| 19-21      |  | Bioaktivt ämne | 10 ml thymol-lösning         |
| 22-24      |  | Bioaktivt ämne | 10 ml citrl-lösning          |



## 2.4. In Vivo undersökning

480 stycken ”Aroma” äpplen, som har låg resistens mot svampangrepp, plockades vid optimal skördetid från Kiviks odling, transporterades till Alnarp, tvättades med destillerat vatten och delades i 16 grupper, med 3 upprepningar i varje grupp och 10 frukter i varje block:

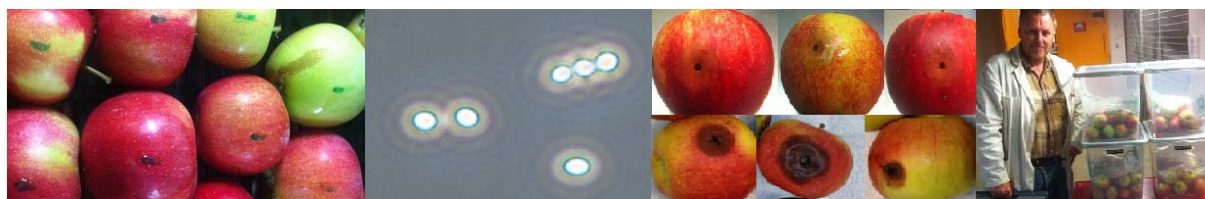
- Varje frukt i grupp (1-8) inokulerades med 20 µl av *P. expansum* suspension, på både den skuggiga samt soliga sidan av frukten.
- Varje frukt i grupp (9-16) inokulerades med 20 µl av *Neofabraea spp.* suspension, på både den skuggiga samt soliga sidan av frukten.

Tre timmar efter inokulationen, behandlades grupperna med olika bioaktiva ämnen (fumigation eller sprutning) enligt tabell 2.

**Tabell 2. In Vivo behandlingar med olika ämnen**

| <i>P. expansum</i> grupp | <i>Neofabraea</i> sp. grupp | Behandling     | Behandlingsmetod och koncentration            |
|--------------------------|-----------------------------|----------------|---|
| 1                        | 9                           | Kontroll       | Ingen   |
| 2                        | 10                          | Lösningsmedel  | Sprutning, 10 ml av Tween 80-lösning/ block   |
| 3                        | 11                          | Lösningsmedel  | Sprutning, 10 ml av soja lecitinlösning/block |
| 4                        | 12                          | Bioaktivt ämne | Fumigation, 20 ml av Mentollösning/ block     |
| 5                        | 13                          | Lösningsmedel  | Fumigation, 20 ml etanol / block              |
| 6                        | 14                          | Bioaktivt ämne | Sprutning, 10 ml eugenol-lösning/ block       |
| 7                        | 15                          | Bioaktivt ämne | Fumigation, 20 ml thymol-lösning/ block       |
| 8                        | 16                          | Bioaktivt ämne | Fumigation, 20 ml citri-lösning/ block        |

Behandlingarna utfördes antingen genom sprutning eller genom ”gasning”. Inokulerad frukt sprutades i en skål. ”Gasningen” utfördes genom att inokulerad frukt placerades i en 250 mls flaska (ett block i varje flaska) medan behandlingslösningen sprutades på filterpapper som fästades på flaskornas sidor (bild 2).



**Bild 2. In Vivo undersökning**

Alla grupper lagrades efter behandlingen i vanlig kylkylare vid 2 °C och 90% luftfuktighet. Efter lagring undersöktes frukten och svampangreppet, svampstillväxten kvantifierades och definierades och resultaten analyserades statistiskt med MINITAB 16.

## Resultat

### 3.1 Effekt av behandlingslösningar på tillväxten av mycel

Tillsatsen av bioaktiva ämnen i petriskålar, resulterade i en sämre myceltillväxt under de följande två-tre veckornas inkubation (bilder 3-6).

#### För *P. expansum*

Behandlingen med citral-lösning minskade tillväxten av mycelium med 98%, medan behandlingarna med eugenol- och thymol-lösning minskade tillväxten med 90-92% jämfört med kontrollen. Mentollösningen minskade också tillväxten av mycelium med 48%. Olika lösningsämnen hade mycket mindre effekt där tillväxten inhibiterades med 4-12% jämfört med kontrollen (Fig. 1).

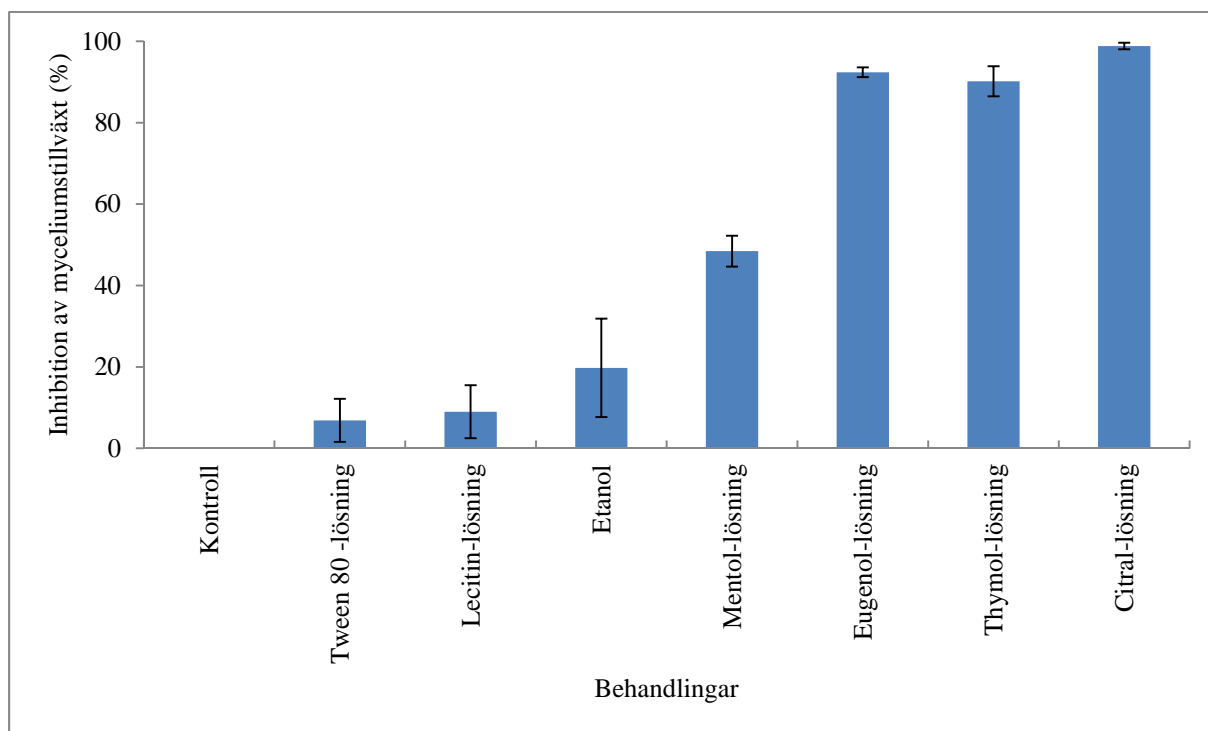


Fig.1. Effekten av behandlingar med olika bioaktiva- och lösningsämnen på tillväxten av mycelium från *P. expansum*.

#### För *Neofabraea* sp.

Citral-, thymol- och eugenol-lösning har nästa likartad positiv effekt, där behandlingen med dessa ämnen minskade tillväxten av mycelium med 96-98% jämfört med kontrollen. Mentollösningen minskade också tillväxten men på en mindre nivå (86%). Bland olika lösningsämnen visade etanol och lecitin en inhibitionseffekt (Fig. 2).

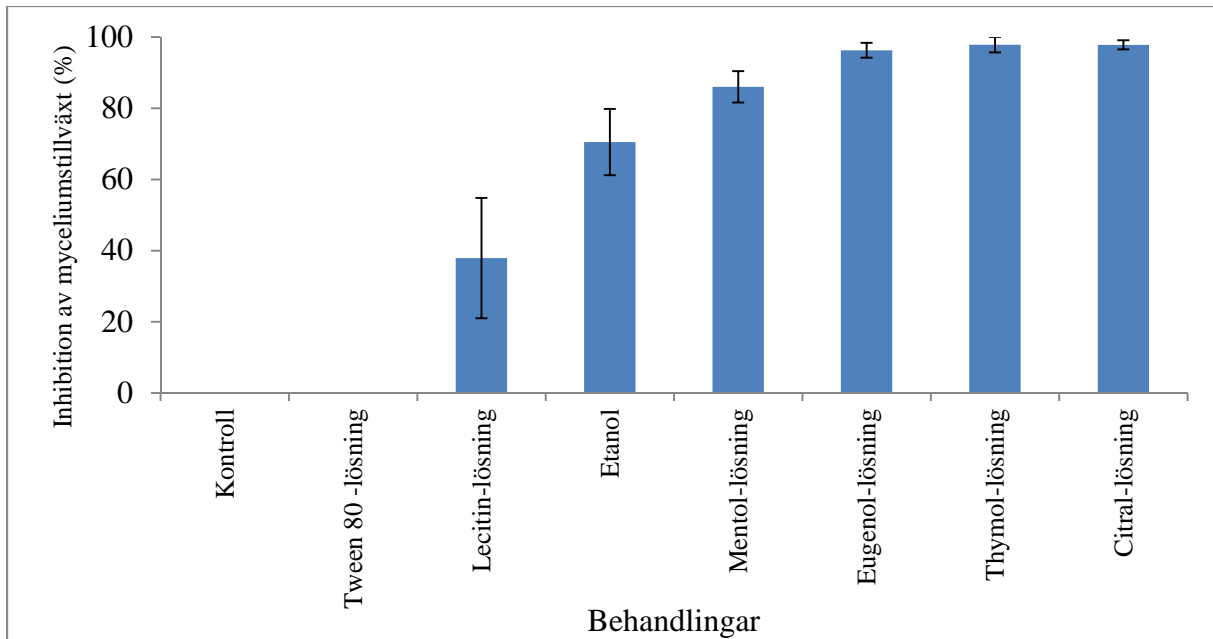
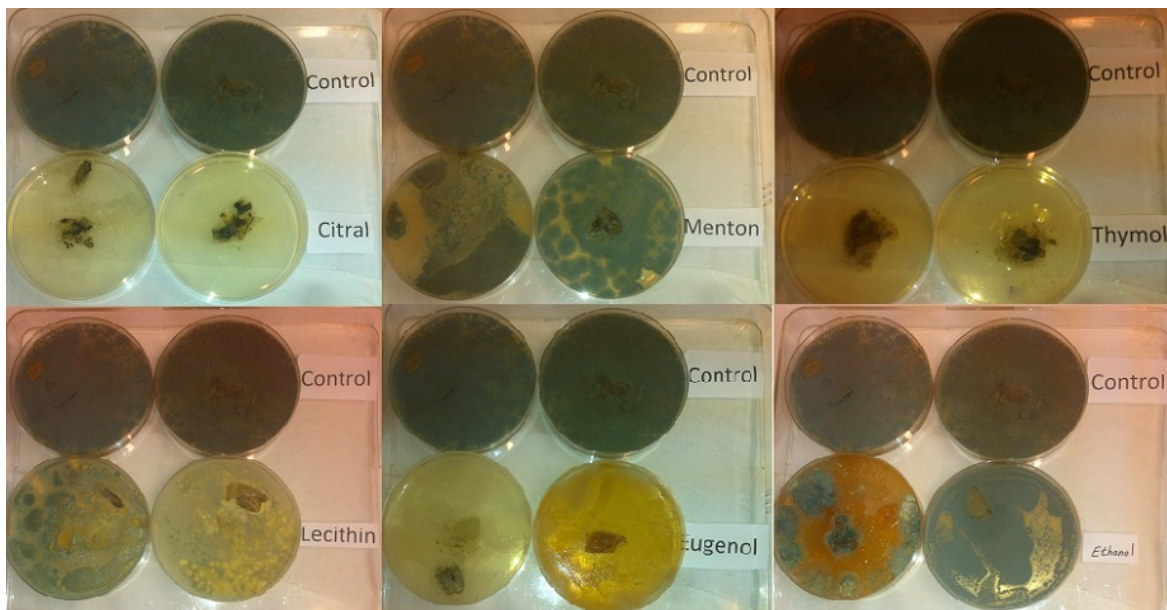
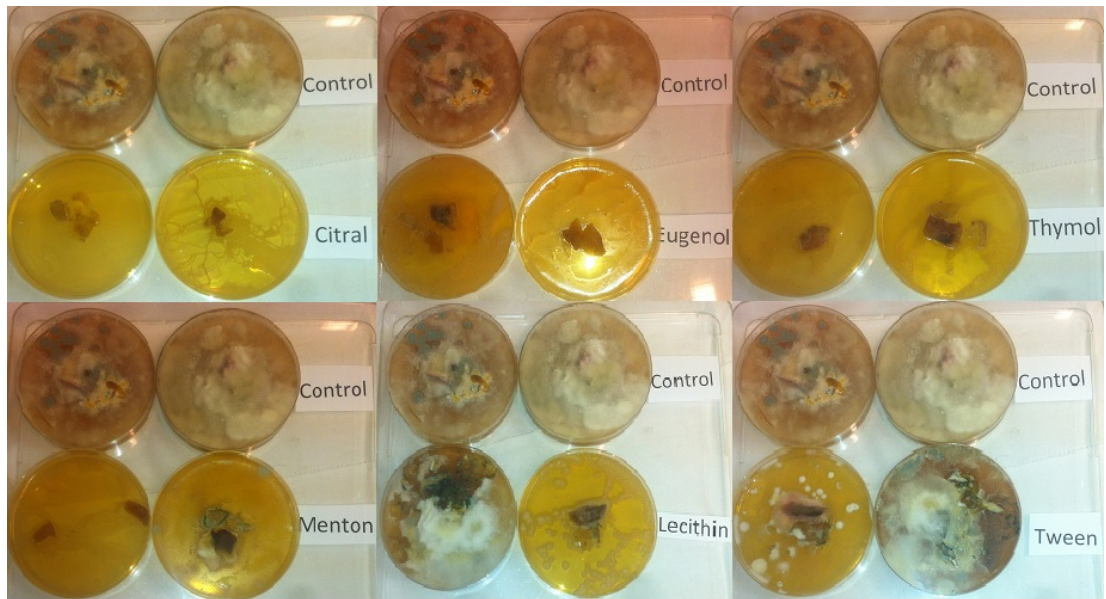


Fig.2. Effekten av behandlingar med olika bioaktiva- och lösningsämnen på tillväxten av mycelium från *Neofabraea* sp.



***Penicillium expansum* 2013**

**Bild 3. Bioaktiva ämnen som minskar tillväxten av mycelium i PDA.**



**Neofabraea spp. 2013**

***Bild 4. Bioaktiva ämnen som minskar tillväxten av mycelium i MEA.***



**Kontroll**

**Citral**

**Tymol**

**Eugenol**

**Menton**

**Penicillium expansum 2013**

***Bild 5. Citral- och thymol-lösningar som stoppade myceliumstillväxten i PDA.***



**Menton**

**Eugenol**

**Tymol**

**Citral**

**Kontroll**

**Neofabraea spp. 2013**

***Bild 6. Eugenol, citral- och thymol-lösningar som stoppade myceliumstillväxten i MEA.***

### 3.2 Effekten av behandlingslösningar på svampangrepp hos "Aroma" äpplen:

Behandlingar med bioaktiva ämnen gav olika grader av skydd mot svampangrepp som orsakades av inokulationen med *P. expansum* och *Neofabraea sp.* (bilder 7-8). Jämfört med obehandlade frukter, inhiberades skador av gråmögel med 17, 19, 25 och 44% för frukt som behandlades med mentol-, eugenol-, citral- och thymol-lösning. Bland lösningsämnena hade bara lecitin en positiv effekt, där skadans diameter minskade med 27% jämfört med kontrollen (Fig. 3).

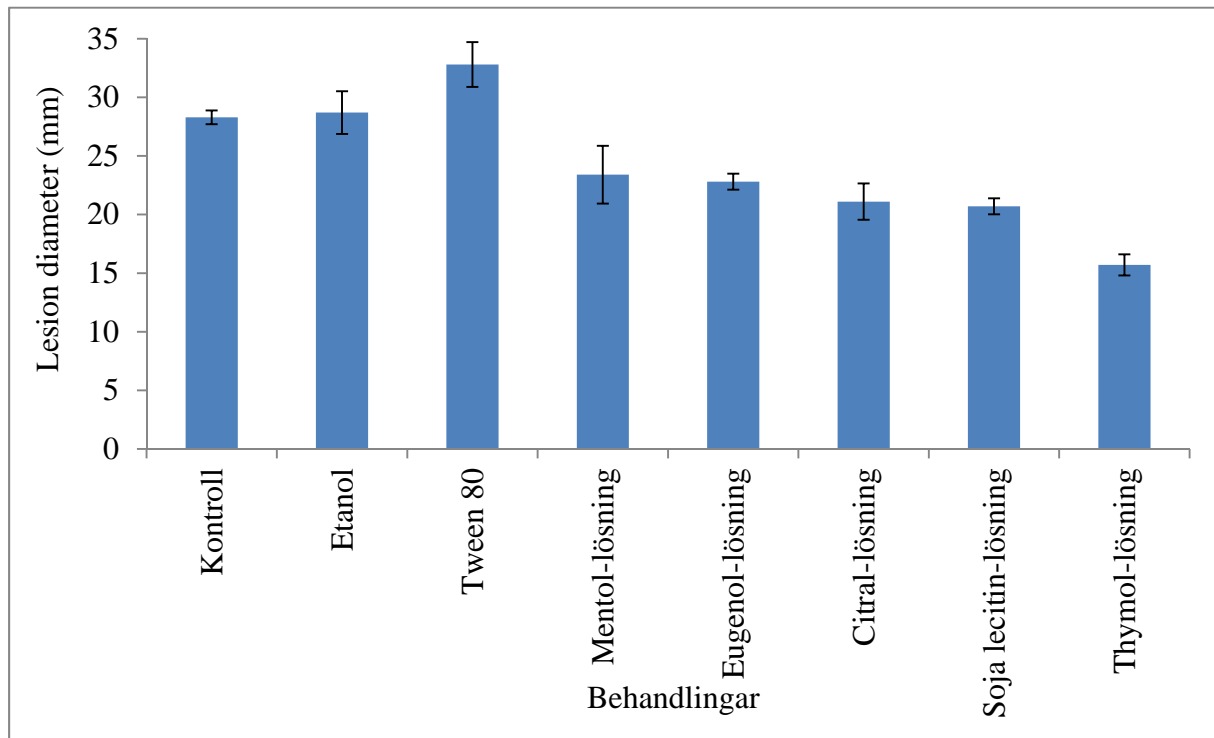


Fig.3. Inverkan av behandlingar med olika bioaktiva- och lösningsämnen på svampangrepp pga. inokulation med *P. expansum*



Bild 7. Citral-lösning utgjorde ett bra skydd mot gråmögel hos "Aroma" äpplen.

Bioaktiva ämnen visade också en inhibitionseffekt på svampangrepp som orsakades av *Neofabraea sp.* Thymol- och citral-lösning inhiberade lagringssjukdoms skador med 60 respektive 58% jämfört med obehandlad frukt. Behandlingar med eugenol- och mentol-lösning hade nästa samma effekt, där skadornas diameter minskade med 31%. Lösningssämnen visade på en svag effekt (Fig. 4).

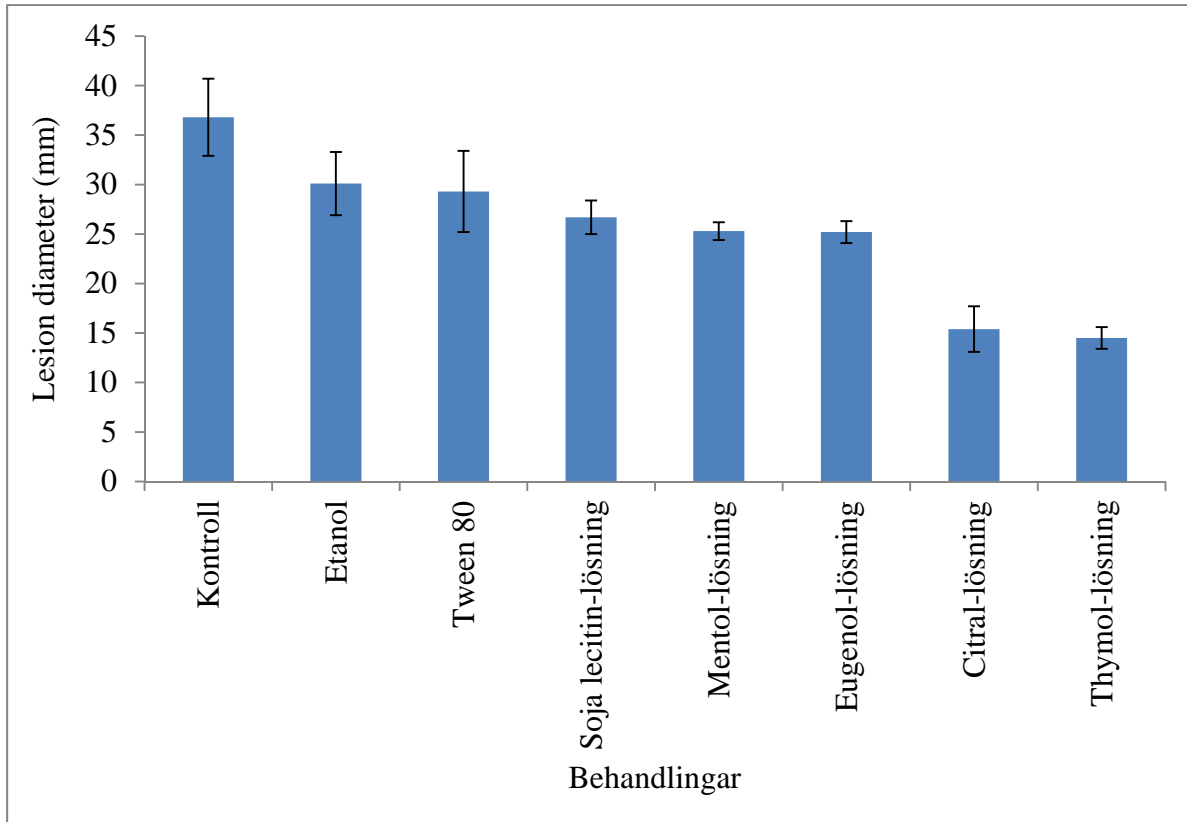


Fig.4. Inverkan av behandlingar med olika bioaktiva- och lösningssämnen på svampangrepp pga. inokulation med *P. expansum*



Bild 8. Thymol-lösning som utgjorde ett bra skydd mot gråmögel hos "Aroma" äpplen.

## Slutsats

Ett antal försök med sammanlagt 8 olika behandlingar, som sprutades på frukter som strax dessförinnan inokulerats med grönmögel eller *Neofabraea*, utfördes. Merparten av dessa lösningar har resulterat i signifikant minskade skador på frukten jämfört med kontrollfrukt som inte behandlats.

Bioaktiva ämnen har visat god förmåga att begränsa såväl myceltillväxt in vitro som virulens, hos konidiesporer, bildade på mycel, i behandlade petriskålar.

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

## Tack

Slutligen vill jag tacka alla som har hjälpt mig att genomföra denna förestudie. Speciellt tack till **Tillväxt Trädgård** för finansieringen av detta försök, **Lars- Olof Börjesson, VD, Äppelriket** för det fantastiska samarbetet och **Karl-Erik Gustavsson, SLU**, för all värdefull hjälp.

## Litteratur

- Amiri A., Dugas R., Pichot A.L., Bompeix G. 2008. In vitro and in vitro activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 126:13–19.
- Henriquez J.L., Sugar D., Spotts R.A. 2008. Effects of environmental factor and cultural practices on bull's eye rot of pear. *Plant Disease* 92:421–424.
- Jönsson Å., Nybom H. 2008. Omläggning av en äppleodling till ekologisk produktion. *Ekologiskt Lantbruk* 4:12–13.
- Jönsson Å., Nybom H., Rumpunen K. 2010. Fungal disease and fruit quality in an apple orchard converted from integrated production to organic production. *J. Sustain. Agr.* 34:15–37.
- Mari M., Leoni O., Iori R., Cembali T. 2002. Antifungal vapour-phase of allyl-isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears. *Plant Pathol.* 51:231–236.
- Mari M., Leoni O., Bernardi R., Neri F., Palmieri S. 2008. Control of brown rot on stonefruit by synthetic and glucosinolate-derived isothiocyanates. *Postharvest Biol. Technol.* 47:61–67.
- Neri F., Mari M., Menniti A., Brigati S. 2006. Control of *Penicillium expansum* disease in pears and apples by trans-2-hexenal vapours. *Postharvest Biol. Technol.* 41:101–108.

- Neri F., Mari M., Menniti A., Brigati S., Bertolini P. 2007. Fungicidal activity of plant volatile compounds for controlling *Monilinia laxa*. *Plant Dis.* 91:30–35.
- Neri F., Mari M., Brigati S., Bertolini P. 2009. Control of *Neofabraea alba* by plant volatile compounds and hot water. *Postharvest Biol. Technol.* 51:425–430.
- Plotto A., Roberts D., Roberts R. 2003. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato. *Acta Hort.* 628:737–745
- Romanazzi G., Karabulut O., Smilanick J. 2007. Combination of chitosan and ethanol to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Boil. Techn.* 45:134–140.
- Spotts R., Seifert P., Wallis K., Sugar D., Xia C. serdani M. and Henriquez J. 2009. Description of *Cryptosporiopsis kienholzii* and species profiles of *Neofabraea* in major pome fruit growing districts in the Pacific Northwest USA. *Mycological research.* 113:1301–1311.
- Tahir I.I. 2006. Control of pre- and postharvest factors to improve apple quality and storability. Dissertation 2006:35, SLU.
- Tahir I.I., Nybom H. 2008. Jämförande försök med skorvresistenta äpplesorter. Fakta från Partnerskap Alnarp, 8:1–4.
- Tsao R., Zhou T. 2000. Antifungal activity of monoterpenoids, against postharvest pathogens *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola*. *J. Essent. Oil Res.* 12:113–121.
- Weber R.W.S., Roland W.S. 2009. An evaluation of possible effects of climate change of pathogenic fungi in apple production using fruit rots as examples. *Erwerbsobstbau* 51:115–120.
- Weibel F., Hahn P., Lieber S., Häseli A., Amsler T., Zingg D. 2005. Lutte contre *Gloeosporium (album et perennans)* des pommes biologiques post-recolte avec des produits oxidants et des eaux électrolytiques, et pre-recolte avec differents produits biologiques entre 2001–2004. Journées Techniques Fruits & Légumes et Viticulture Biologiques, p. 120.

\*\*\*\*\*