



Blomdoftsavgivning i rödklöver i relation till pollinationseffekter

Floral scent emission in red clover in relation to pollination effects

Emelie Liffner

Självständigt arbete • 15 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Institutionen för Biosystem och teknologi
Trädgårdsingenjörsprogrammet – Odling
Alnarp 2024



Blomdoftsavgivning i rödklöver i relation till pollinationseffekter

Floral scent emission in red clover in relation to pollination effects

Emelie Liffner

Handledare: Mattias Larsson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för växtskyddsbiologi
Bitr. handledare: Åsa Lankinen, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för växtskyddsbiologi
Examinator: Björn Bohman, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för växtskyddsbiologi

Omfattning: 15 hp
Nivå och fördjupning: G2E
Kurstitel: Självständigt arbete i Trädgårdsvetenskap
Kurskod: EX0844
Program/utbildning: Trädgårdsingenjörsprogrammet – Odling
Kursansvarig inst.: Institutionen för Biosystem och teknologi

Utgivningsort: Alnarp
Utgivningsår: 2024
Omslagsbild: Mattias Larsson

Nyckelord: Trifolium pratense L., frösättning, klöverfröproduktion

Tabeller och figurer är skribentens egna om inget annat anges.

Sveriges lantbruksuniversitet
LTV-fakulteten
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

För att bidra till en hållbar livsmedelsproduktion, behöver den variabla frösättningen hos rödklöver stabiliseras. Vad variationen beror på är däremot inte helt klarlagt. För att sätta frö behöver småblommorna i klöverhuvudet korspollineras av pollinatörer. Därför är det av intresse att undersöka möjliga faktorer till låg pollinationsgrad och därmed låg grad av frösättning. Eftersom blomdoft lockar pollinatörer och kan indikera blommans mottaglighet för pollination, har jag i denna studie undersökt hur klöverhuvudets doft förändras i och med pollination, och om det finns något samband mellan blomdoft och frösättningsgrad.

Studien har baserats på tidigare insamlat material bestående av klöverhuvuden och doftprover från dessa. Analys av doftprover har fokuserat på specifika doftämnen. Doften från utslagna, täckta blomsterhuvuden har jämförts med doftämnen från utslagna huvuden som öppet pollinerats under 48 timmar och kontrollerats mot doftprover från icke utslagna klöverhuvuden i knoppstadiet. Kontrollen har syftat till att testa om vissa blomdoftsämnen ökar när blommorna är utslagna och mottagliga för pollination. I studien har även frösättningsgraden undersökts, menat hur många procent av småblommorna per klöverhuvud som satt frö. Detta för att slutligen undersöka huruvida det förekommer ett samband mellan grad av frösättning och doftavgivning.

Resultatet indikerar att halten utvalda blomdoftsämnen generellt är lägst i knoppstadiet, för att sedan öka när blommorna slagit ut, men därefter sjunka då klöverhuvudena pollinerats och satt frö. Samtidigt tyder resultatet på att vissa blomdoftsämnen avges i mer konstant halt över klöverhuvudets olika utvecklingsstadier. Gällande graden av frösättning visar resultatet enligt förväntan en väsentligt högre frösättning hos klöverhuvuden som öppet pollinerats, jämfört med klöverhuvuden som varit täckta. Däremot kan ingen korrelation ses mellan graden av frösättning och mängden doft i pollinerade blommor. Arbetet avslutas med förslag på hur förbättringar kan ge mer tillförlitliga resultat.

Nyckelord: *Trifolium pratense* L., frösättning, klöverfröproduktion...

Abstract

To contribute to sustainable food production, the variable seeding rate in red clover needs to be stabilized. However, what the variation is due to is not fully understood. To set seed, the florets in the clover head need to be cross-pollinated by pollinators. Therefore, it is of interest to investigate possible factors for a low pollination rate and thus a low seed setting rate. Since floral scent attracts pollinators and can indicate the flower's susceptibility to pollination, in this study I have investigated how the scent of the clover head changes with pollination, and whether there is any relationship between floral scent and seed set rate.

The study has been based on previously collected material consisting of clover heads and scent samples from them. Analysis of scent samples has focused on specific scent compounds. The scent of open, covered flower heads has been compared with odorants from open heads that had been open pollinated for 48 hours and checked against scent samples from unpollinated bud-stage clover heads. The control was aimed at testing whether certain floral scent compounds increase when the flowers are opened and susceptible to pollination. In the study, the seeding rate was also investigated, meaning how many percent of the florets per clover head set seed. This is to finally investigate whether there is a relationship between degree of seeding and scent emission.

The result indicates that the content of selected floral scent compounds is generally lowest in the bud stage, then increases when the flowers have bloomed, but then drops when the clover heads have been pollinated and set seed. At the same time, the results indicate that certain flower scent compounds are emitted in more constant levels across the different development stages of the clover head. Regarding the rate of seeding, the result shows, as expected, a significantly higher seeding in clover heads that were open pollinated, compared to clover heads that were covered. However, no correlation can be seen between the degree of seed setting and the amount of fragrance in pollinated flowers. The work concludes with suggestions on how improvements can produce more reliable results.

Keywords: *Trifolium pratense* L., seed set, clover seed production...

Innehållsförteckning

Tabellförteckning	8
Figurförteckning.....	9
1. Inledning.....	11
1.1. Bakgrund	11
1.2. Syfte och hypotes	12
1.3. Frågeställningar.....	12
1.4. Genomförande och avgränsningar	13
2. Material och metod.....	14
2.1. Material.....	14
2.2. Metod.....	14
2.2.1. Insamling av material.....	14
2.2.2. Fröräkning.....	15
2.2.3. Identifiering av doftämnen	16
2.2.4. Statistisk analys.....	17
3. Resultat	18
3.1. Frösättningsgrad	18
3.2. Blomdoftsämnen	19
3.3. Doft i relation till frösättningsgrad.....	23
4. Diskussion och slutsats	25
Referenser	28
Tack	32
Bilaga 1. Täckta klöverhuvuden	33
Bilaga 2. Öppet pollinerade klöverhuvuden.....	34
Bilaga 3. Doftprover	35
Bilaga 4. Frösättningsgrad Betty. n=9.	36
Bilaga 5. Blomdoftsämnen Betty. n=3	37
Bilaga 6. Blomdoftsämnen Betty. n=3.	38

Tabellförteckning

- Tabell 1. Jämförelse av blomdoftämnen halt mellan klöverhuvuden i knopp och täckta klöverhuvuden, samt mellan täckta och öppet pollinerade, genom tvåsidigt fördelade tvåsmpeltest med lika varians. Ett p-värde $<0,05$ indikerar signifikant skillnad och markeras med fetstil.....22
- Tabell 2. Resultat av regressionsanalys av vardera doftämnes halt och frösättningsgraden hos öppet pollinerade klöverhuvuden. Multipel-R och R-kvadrat nära 1 samt ett p-värde $<0,05$ tyder på korrelation.....23

Figurförteckning

- Figur 1. Foto över pågående fröräkning. a=oskadad med frö, b=oskadad utan frö, c=skadad med frö, d= skadad utan frö. Blommor mellan kolumnerna c och d har inte sorterats vid tidpunkten för fotografering.....15
- Figur 2. Foto på hur en skadad blomma kunde se ut.16
- Figur 3. Låddiagram över procentuell frösättningsgrad i medeltal för täckta respektive öppet pollinerade prov, inklusive standardavvikelser. Täckta: n = 42. Öppet pollinerade: n=45.....18
- Figur 4. Stapeldiagram över halten acetofenon i nanogram per klöverhuvud för respektive behandling. Diagrammet visar medelvärden och standardavvikelser. n=14.19
- Figur 5. Stapeldiagram över blomdoftsämnen uppskattade mängd (ng/klöverhuvud) för respektive behandling. Diagrammet visar medelvärden och standardavvikelser. n=14.....20
- Figur 6. Stapeldiagram över blomdoftämnen halt i medel (ng/klöverhuvud) inklusive standardavvikelser. n=14.21
- Figur 7. Punktdiagram över halten acetofenon i relation till frösättningsgraden hos öppet pollinerade klöverhuvuden. En punkt motsvarar ett klöverhuvud och värdena är baserade på medelvärden för tre klöverhuvuden.24
- Figur 8. Punktdiagram över halten 5-hepten-2-on i relation till frösättningsgraden hos öppet pollinerade klöverhuvuden. En punkt motsvarar ett klöverhuvud och värdena är baserade på medelvärden för tre klöverhuvuden.24

1. Inledning

1.1. Bakgrund

Jordbrukets produktion ligger till grund för livsmedelsförsörjningen. Samtidigt har global befolkningsökning och intensifierad livsmedelsproduktion lett till negativa konsekvenser för klimat, miljö och biologisk mångfald REF (Hederström 2019). Den biologiska mångfalden har minskat på grund av det senaste århundradets ökning av monokulturer och användning av kemiska medel inom jordbruket. För en mer hållbar produktion behöver jordbruket dessutom minska sina utsläpp av bland annat koldioxid (Naturvårdsverket 2023). Vidare medför produktionen kväveläckage till luft och vatten vilket orsakar luftföroreningar samt försurning och övergödning.

Rödklöver är kvävefixerande, vilket minskar behovet av gödsling och är särskilt värdefullt vid ekologisk produktion (Lankinen & Öhlund 2013). Förutom som gröngödslingsgröda odlas rödklöver för att producera grovfoder med hög proteinkvalitet och är Sveriges mest använda vallbaljväxt (SLU Grogrund 2023a). Vall är Sveriges mest odlade gröda och bidrar till kolinlagring (SLU Grogrund 2023b). Rödklöver utgör samtidigt en viktig födokälla för humlor och gynnar på så vis biologisk mångfald (Sundahl 2015). Rödklöver är dessutom mer torktålig än vitklöver (Jing et al. 2021a). Efterfrågan på rödklöver förväntas därför öka i och med klimatförändringarna (Lüscher et al. 2014).

Odling av rödklöver kräver utsäde i form av frön (Lankinen & Öhlund 2013). Variationen i avkastning vid klöverfröproduktion är dock stor. Hög och stabil avkastning är avgörande för en hållbar livsmedelsproduktion, och ligger till grund för det pågående forskningsprojektet och Grogrundsamarbetet 'Växtförädling för ökad fröavkastning hos rödklöver' (SLU Grogrund 2023b). Fröavkastningen i rödklöver påverkas av många olika faktorer, men vad variationen beror på är inte helt klarlagt (Hederström 2019). Ett av de främsta förädlingsmålen i rödklöver har varit stor grönmassa – en egenskap som visat sig vara svårkombinerad med hög och stabil fröavkastning (Jing et al. 2021c). Den naturliga ploidinivån för rödklöver är diploid, medan tetraploida sorter med fördubblat antal kromosomuppsättningar

förädlats fram. De tetraploida sorterna har större grönmassa och lägre fröavkastning jämfört med de diploida.

Minskande fröavkastning och ökad variation kan orsakas av bristande pollination (Bommarco et al. 2012). Ett klöverhuvud består av runt hundra småblommor, och för att sätta frö behöver korspollination av insekter ske mellan individer, då rödklöver har hög självinkompatibilitet (Jing et al. 2021c). En blomma är mottaglig för pollination i upp till 10 dagar. Ju fler blommor som pollineras, desto fler har möjlighet att sätta frö.

Blomdoft är ett sätt för många blommande växter att attrahera pollinatörer (Raguso & Pellmyr 1998). Doften signalerar att det finns föda i form av pollen eller nektar. Pollinatörers preferenser kan påverkas av doftens sammansättning och intensitet (Raguso 2008). När blommor pollinerats slutar de ofta att avge doft (Rodriguez-Saona et al. 2011). En nedstängning av blomdoft kan vara en tidig indikation på att ett blomhuvud inte längre är mottagligt för pollination. Med anledning av detta är det intressant att studera relationen mellan pollinering och nedstängning av blomdoft hos rödklöver.

1.2. Syfte och hypotes

Målet är att bidra till ökad förståelse om vad som påverkar fröavkastningen hos rödklöver. Syftet är att se om det finns ett samband mellan pollination och nedstängning av blomdoft, det vill säga om graden av pollination och halten blomdoftsämnen är korrelerade. Anledningen är att detta skulle kunna ge en ledtråd om förädling för längre blomdoftsperioder kan leda till ökad frösättning. Hypotesen är att blomdoften ökar när småblommorna i klöverhuvudet öppnas och avtar när de pollineras och befruktas. Minskningen i doft kan vara en tidig detekterbar signal på att blommornas mottaglighet för pollination minskar, och låg frösättning kan bero på att nedstängning av doft sker innan majoriteten av småblommorna har pollinerats.

1.3. Frågeställningar

1. Skiljer sig frösättningsgraden mellan täckta och öppet pollinerade klöverhuvuden?
2. Skiljer sig doftavgivningen av respektive målämne hos klöverhuvuden i knoppstadiet gentemot hos täckta klöverhuvuden?
3. Skiljer sig doftavgivningen av respektive målämne hos täckta gentemot hos klöverhuvuden som öppet pollinerats?
4. Finns det någon korrelation mellan klöverhuvudens frösättningsgrad och målämnens halt?

1.4. Genomförande och avgränsningar

Undersökningen har genomförts som en empirisk studie där insamlade prover analyserats. Litterära källor har använts för att beskriva bakgrunden, samt i metodavsnittet och diskussionen av resultatet. Fröförekomst har detekterats och småblommor med respektive utan fröförekomst räknats för att bestämma frösättningsgraden hos klöverhuvuden. Doftprover har kemiskt analyserats för att tentativt identifiera doftämnen. Resulterande data har med statistiska metoder analyserats för att studera eventuella skillnader och samband.

Inför fröräkningen har en demonstration över proceduren erhållits. Kemisk analys har föregåtts av instruktioner, bekantskap med programmet och inläring av tillvägagångssättet. Förståelse av metoderna för insamling av material har fördjupats genom närvaro vid doftuppsamling och extraktion av doftämnen, samt genom en demonstration av proceduren för GC-MS. Litteratur och diskussioner har givit ytterligare bekantskap med aktuella metoder och områden för studien.

För passande omfattning har ämnet avgränsats genom att enbart studera doftavgivning och frösättningsgrad, med vetskapen att olika faktorer kan avgöra fröavkastningen hos rödklöver, exempelvis låg fertilitet, ofullständig fröutveckling och förluster under skördemomentet (Jing et al. 2021a). Identifieringen av doftämnen har varit preliminär, baserat på jämförelser mellan masspektra från referensbaser, och inte på jämförelser med retentionstider och masspektra från syntetiska standarder. Studien har på grund av dess syfte samt tidsramen för genomförandet avgränsats till att undersöka 20 förutbestämda doftämnen, och inte studera samtliga förekommande doftämnen. Vidare utesluter studien jämförelser mellan olika klöversorter och olika tidsintervall för pollination för lämplig omfattning. Slutligen används enbart enklare statistiska analyser i form av parvisa jämförelser av medelvärden, samt korrelationer mellan variabler.

2. Material och metod

2.1. Material

Undersökningen utgick från material insamlat sensommaren 2023 av Marina Emelianova, vid Alnarps trädgårdslaboratorium, utanför denna studie. Materialet bestod dels av utslagna klöverhuvuden som öppet pollinerats under 48 timmar, dels utslagna täckta klöverhuvuden, samt doftprover från båda dessa grupper. Även doftprover från klöverhuvuden i knoppstadiet ingick i materialet som kontroll. Sorterna var de tetraploida Betty, Holly, Peggy och Vicky samt den diploida sorten Yngve. Totalt innefattade materialet till denna studie prover bestående av 87 klöverhuvuden (Bilaga 1 och 2) med tillhörande 45 doftprover (Bilaga 3).

2.2. Metod

2.2.1. Insamling av material

Insamlingen av doftprover och klöverhuvuden har skett utanför ramen för examensarbetet. Detta är en kort förklaring av proceduren och rådande förhållanden för att ge en kontext. Uppsamling av dofter från blommor skedde från grupper av tre klöverhuvuden samtidigt. Dels från klöverhuvuden i knoppstadiet, det vill säga där småblommorna ännu inte öppnat sig. Resterande klöverhuvuden hade tidigare förts ihop tre och tre och täcktes med påsar av nylonnät innan småblommorna slagit ut. När blommorna öppnats avlägsnades en del av påsarna för öppen pollinering under 48 timmar, varefter klöverhuvudena täcktes av en stekpåse och dofter samlades upp från dessa under fem timmar (från ca 10.00 till 15.00) innan de ursprungliga nylonpåsarerna återfördes. Doftuppsamlingen från täckta blomhuvuden gjordes parallellt från blomhuvuden där nylonpåsarerna avlägsnades omedelbart innan stekpåsen placerades över blomhuvudena, för att undvika pollination. Doftuppsamlingen skedde genom att luft pumpades ut ur påsen och genom ett filter bestående av en teflontub innehållande 25 mg absorbent (Poarpak G, Supelco) (Larsson et al. 2021). Under perioden för doftuppsamling rådde ostadigt väder,

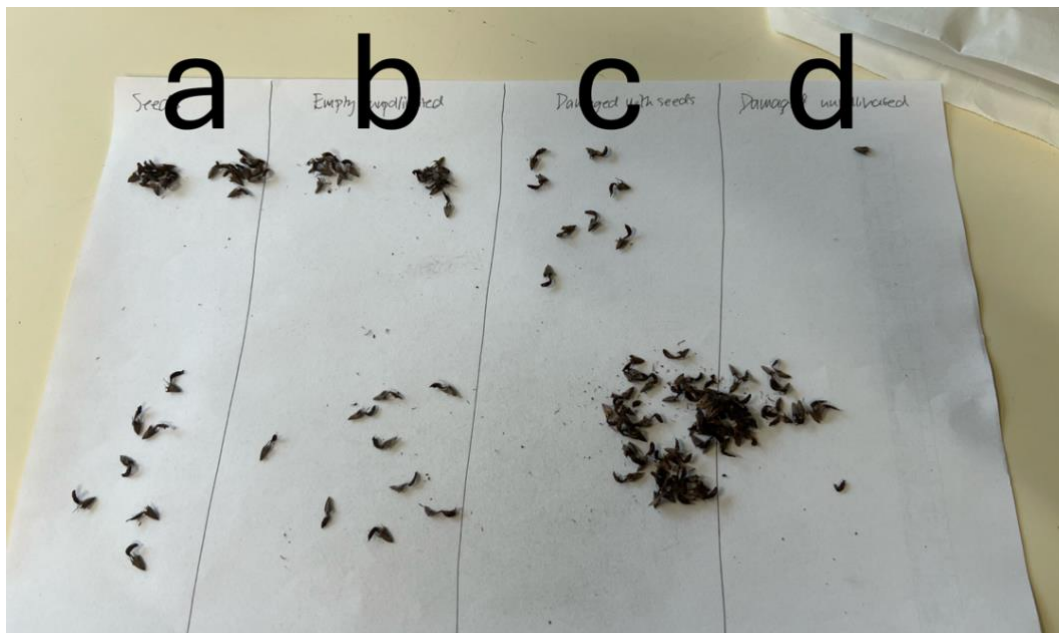
vilket kan ha påverkat ämnens halter. Klöverhuvudena förblev täckta av nylonpåsarna efter doftuppsamlingen och plockades efter ytterligare ca 2 veckor när de mognat och vissnat och sparades i frys vid -20°C.

Ur filtret extraherades doftämnen med lösningsmedel (2 x 150 µL hexan) ned i en 1,5 ml glasvial, varefter en intern standard tillfördes (trans-anetol, 1 µg tillförts som 10 µL hexan med koncentrationen 100 ng trans-anetol/µL). Proverna sparades därefter i frys vid -20°C. Den interna standarden syftade till att göra en approximativ bestämning av mängderna av ämnen i provet genom att jämföra med en känd mängd av den interna standarden.

Proverna koncentrerades under kvävgas till ca 50 µL och injicerades sedan på en gaskromatograf kopplat till masspektrometer (GC-MS) för analys. Metoderna för GC-MS följde i stort sett procedurerna i Molander et al. (2022) för analyser vid SLU Alnarp, med vissa variationer. I korthet gjordes injektionerna (2 µL) med autoinjektor på en DB-WAX-kolonn (60 m x 0,25) med temperaturprogrammet 40°C i tre minuter, följt av 8°C/minut till 225°C med 10 minuters sluttemperatur.

2.2.2. Fröräkning

För att få fram graden av frösättning användes en tidigare framtagen metod (Hederström et al. 2021). Antalet småblommor per klöverhuvud räknades samtidigt som det med fingertoppen kändes efter fröförekomst. En småblomma representerades av ett sammansatt foderblad. Vid osäkerhet om fröförekomst öppnades foderbladet. För varje klöverhuvud sorterades småblommorna i grupper om tio i kolumner enligt fyra kategorier (Figur 1).



Figur 1. Foto över pågående fröräkning. a=oskadad med frö, b=oskadad utan frö, c=skadad med frö, d= skadad utan frö. Blommor mellan kolumnerna c och d har inte sorterats vid tidpunkten för fotografiering.

Till oskadade småblommor räknades hela foderblad och till skadade räknades foderblad med hål i sig eller som på annat sätt inte var hela (Figur 2). Vid slutförd sortering av ett prov räknades materialet i vardera kolumn.



Figur 2. Foto på hur en skadad blomma kunde se ut.

2.2.3. Identifiering av doftämnen

Analysen utgick från 20 förutbestämda ämnen dels från tidigare publicerade studier (Buttery et al. 1984; Valentin 2022), och dels från preliminära analyser av doftuppsamlingar från klöverknoppar, opollinerade och pollinerade klöverblommor enligt Larsson¹. Av de 45 doftproverna i denna studie analyserades 42 prover av skribenten själv. Doftämnen identifierades via kemisk identifiering i programmet HP/Agilent GC-MS Postrun Data Analysis genom att kromatogram med toppar för de olika doftämnena analyserades. Masspektra för olika toppar jämfördes med referenspektra från databaser för att tentativt identifiera doftämnen, och de relativa mängderna av varje ämne mättes genom toppens area. I analysprogrammet undersöktes om de utvalda målämnen fanns genom att fokusera på toppar nära känd ungefärlig retentionstid. Målämnen identifierades preliminärt genom att jämföra deras masspektra med referenspektra från referensdatabaserna NIST 20 och Wiley 12. Spektra för varje målämne jämfördes också mellan alla proverna för att bekräfta att retentionstid och spektra motsvarade samma ämne genom alla prover.

¹ Mattias Larsson, universitetslektor vid Institutionen för växtskyddsbiologi, SLU Alnarp. Personlig kommunikation, 2024.

2.2.4. Statistisk analys

Frösättningsgrad

Antal småblommor med frö dividerades med det totala antalet småblommor för täckta respektive öppet pollinerade prov. Detta gav medelvärden av frösättningsgraden i procent. Genom ett tvåsidigt fördelat t-test med lika varians, togs ett p-värde fram för att visa om skillnaden var statistiskt signifikant, med en signifikansnivå på 95%.

Doftämnen

Ett ämnes mängd i nanogram per prov uppskattades genom att dividera ämnets area med provets area av anetol, samt multiplicera med 1000 ng (motsvarande mängden anetol i provet). Den uppskattade genomsnittliga uppsamlade mängden av ett ämne per blomhuvud i ett prov räknades ut genom att dividera ämnets mängd med det antal blomhuvuden som ingått i uppsamlingen. I undantagsfall kunde endast 2 blomhuvuden användas i en uppsamling, och därför behövde proverna justeras för dessa skillnader. Ett ämnes medelmängd i nanogram per klöverhuvud för vardera behandling räknades ut genom att summera ämnets mängd per klöverhuvud för behandlings samtliga prov och dividera summan med antalet prover i behandlingen. För varje ämne utfördes t-test för att se om halten skiljde sig signifikant åt, dels mellan blomknoppar och täckta klöverhuvuden, dels mellan täckta och öppet pollinerade blomhuvuden.

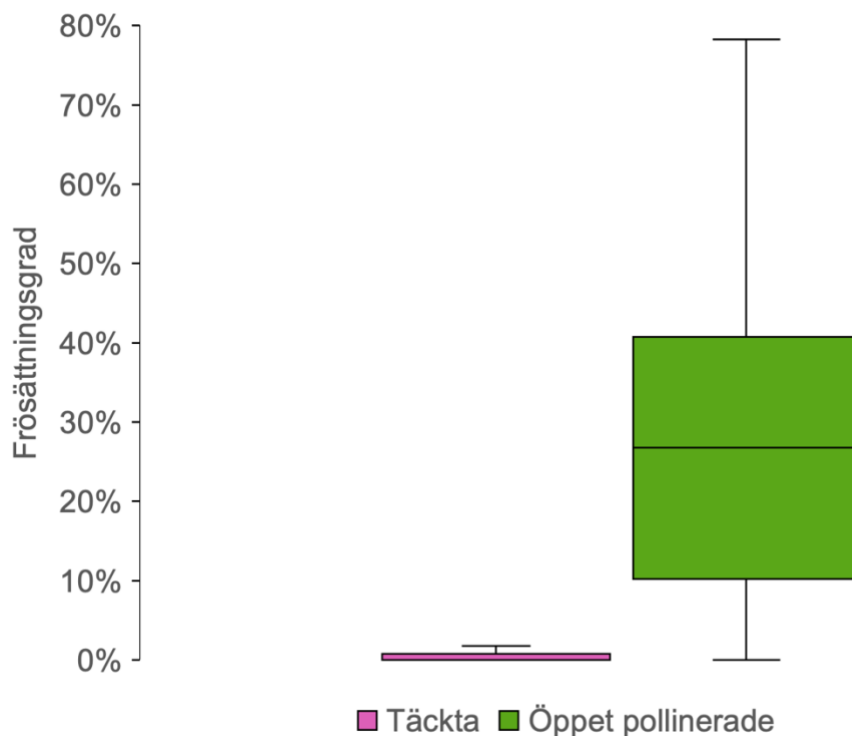
Doftämnen i relation till frösättningsgrad

Data från fröräkningen av klöverhuvuden som öppet pollinerats sammanställdes med data från kemisk analys av tillhörande doftprover, för att se om det fanns någon korrelation mellan frösättningsgrad och halten av ett doftämne. För vardera ämne gjordes en regressionsanalys mellan frösättningsgraden och mängden av ett ämne. Analysen gav dels korrelationskoefficienten med ett värde mellan 0 och 1 där ett lågt värde antyder att variablerna inte är korrelerade. Förklaringsmättet R-kvadrat anger hur många procent av variansen i den ena variabeln som beror på variansen i den andra. Från analysen användes även p-värden för att bestämma signifikansen med en signifikansnivå på 95%.

3. Resultat

3.1. Frösättningsgrad

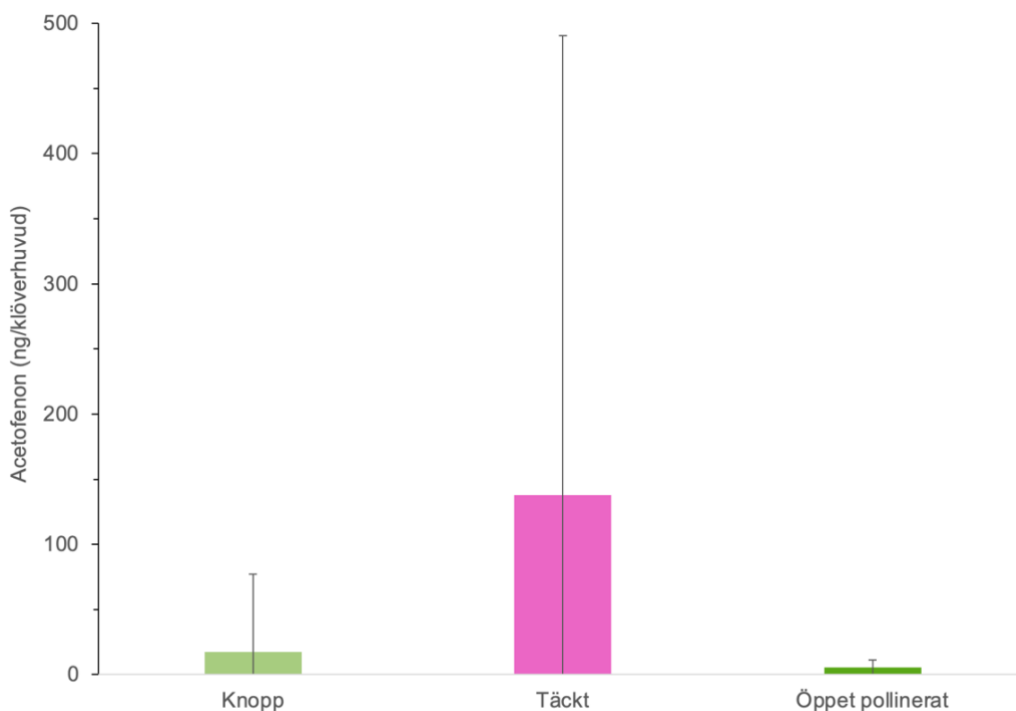
Täckta klöverhuvuden visar i snitt en frösättningsgrad på 1% medan hos öppet pollinerade blomhuvuden är frösättningsgraden ungefär 28% i snitt (Figur 3). T-testet visar ett p-värde på 0,00000000000002, vilket indikerar en mycket hög grad av signifikant skillnad i frösättningsgrad mellan täckta klöverhuvuden och klöverhuvuden som öppet pollinerats under 48 timmar.



Figur 3. Låddiagram över procentuell frösättningsgrad i medeltal för täckta respektive öppet pollinerade prov, inklusive standardavvikelser. Täckta: $n = 42$. Öppet pollinerade: $n=45$.

3.2. Blomdoftsämnen

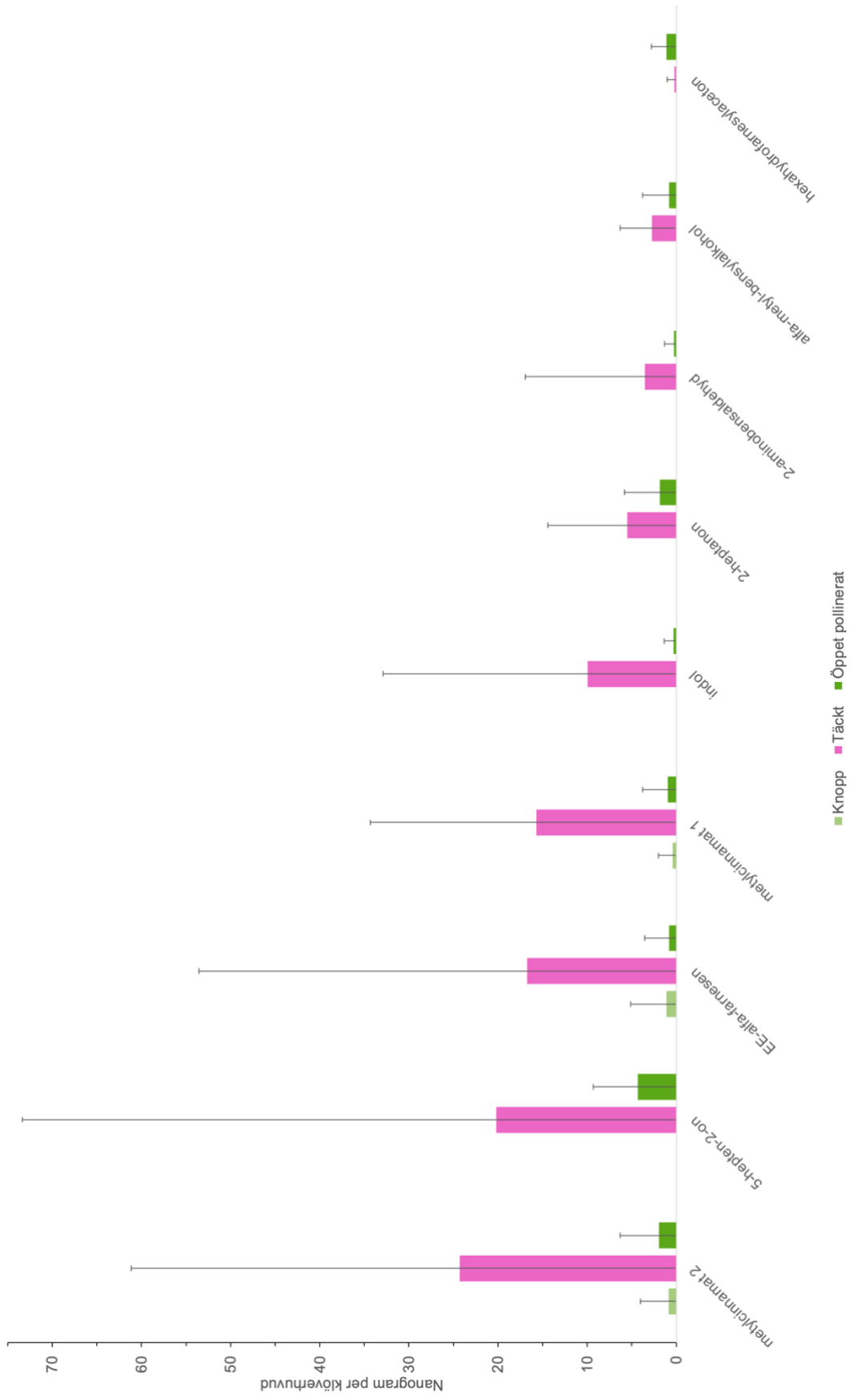
I den kemiska analysen har 13 blomdoftsämnen tentativt identifierats; acetofenon, metylcinnamat 2, 5-hepten-2-on, EE- α -farnesen, metylcinnamat 1, indol, 2-heptanon, 2-aminobensaldehyd, α -metyl-bensylalkohol, hexahydrofarnesylacetone, Z- β -ocimen, E- β -ocimen och karyofyllen (Figur 4, 5 och 6). Generellt ses låga halter jämfört med tidigare år², mest troligt på grund av väderpåverkan. Ämnen benämnda metylcinnamat 1 och metylcinnamat 2 antas vara olika isomerer av metylcinnamat. Halten acetofenon överstiger övriga i sådan grad att ämnet illustreras i ett eget stapeldiagram i figur 4.



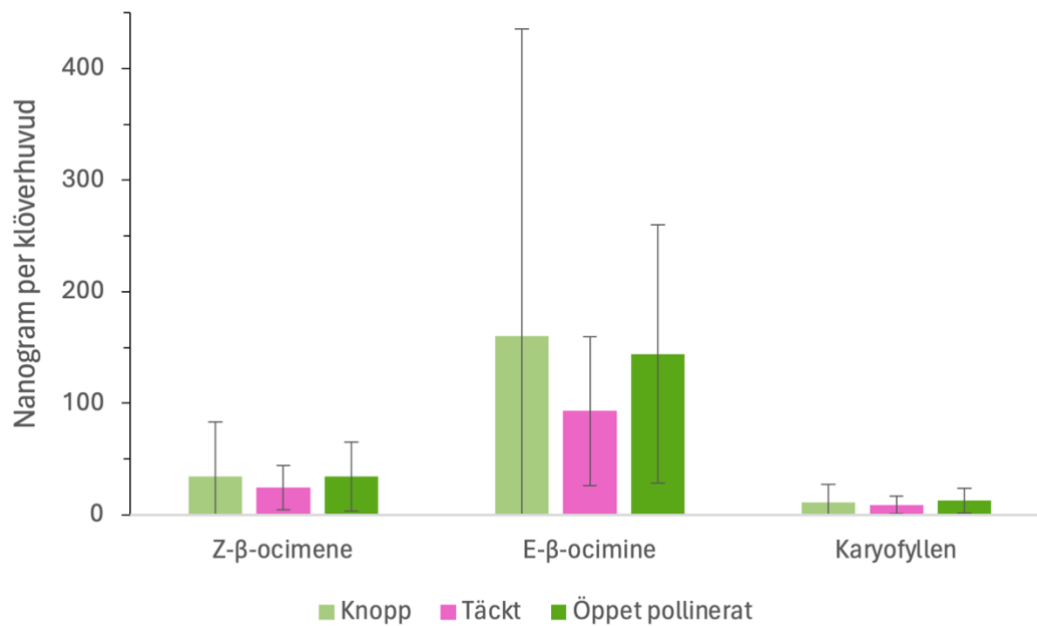
Figur 4. Stapeldiagram över halten acetofenon i nanogram per klöverhuvud för respektive behandling. Diagrammet visar medelvärden och standardavvikelser. $n=14$.

Halterna av resterande identifierade blomdoftsämnen illustreras i figur 5 och 6. För vardera ämnet visas tre staplar där varje stapel representerar ämnets halt i respektive behandling.

² Mattias Larsson, universitetslektor vid Institutionen för växtskyddsbiologi, SLU Alnarp. Personlig kommunikation, 2024.



Figur 5. Stapeldiagram över blodloftsammans uppskattade mängd (ng/klöverhuvud) för respektive behandling. Diagrammet visar medelvärden och standardavvikelser. n=14.



Figur 6. Stapeldiagram över blomdoftämnen halt i medel (ng/klöverhuvud) inklusive standardavvikelser. n=14.

Resultatet indikerar att de flesta blomdoftsämnen förekommer i lägre halt hos klöverhuvuden i knoppstadiet jämfört med hos täckta blomhuvuden, även om stor variation i doftavgivning mellan proverna begränsade möjligheterna att hitta signifikanta skillnader. Skillnaden i doftavgivning mellan knopp och täckt är signifikant för fyra ämnen (Tabell 1). Två av dessa doftämnen, förekommer samtidigt i signifikant lägre halt hos öppet pollinerade, jämfört med täckta klöverhuvuden. Resultatet tyder på att de flesta utvalda blomdoftsämnen avges i lägre halt från klöverhuvuden som öppet pollinerats, jämfört med täckta.

Tabell 1. Jämförelse av blomdoftämnenes halt mellan klöverhuvuden i knopp och täckta klöverhuvuden, samt mellan täckta och öppet pollinerade, genom tvåsidigt fördelade tvåsmpeltest med lika varians. Ett p-värde < 0,05 indikerar signifikant skillnad och markeras med fetstil.

Ämne	p-värde knopp;täckta	p-värde täckta;öppet pollinerade
acetofenon	0,22	0,17
metylcinnamat 2	0,03	0,03
5-hepten-2-on	0,17	0,28
EE- α -farnesen	0,12	0,12
metylcinnamat 1	0,01	0,01
indol	0,12	0,13
2-heptanon	0,03	0,17
2-aminobensaldehyd	0,33	0,37
α -metyl-bensylalkohol	0,01	0,13
hexahydrofarnesylaceton	0,33	0,10
Z- β -ocimen	0,59	0,34
E- β -ocimen	0,39	0,18
karyofyllen	0,64	0,31

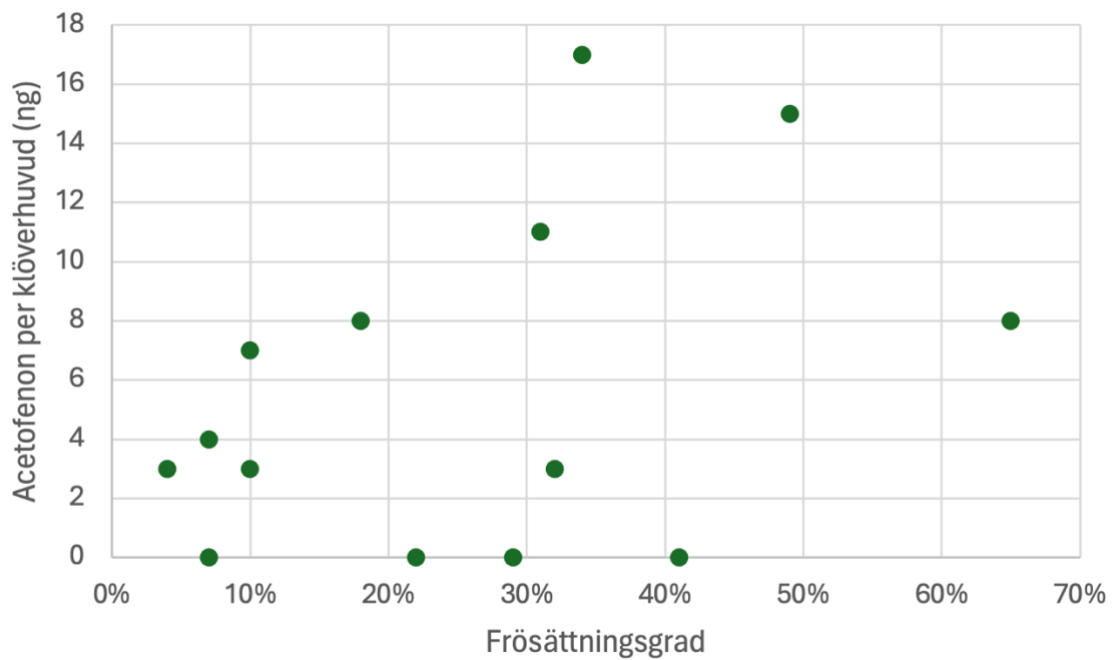
3.3. Doft i relation till frösättningsgrad

Ingen signifikant korrelation kunde påvisas mellan ett öppet pollinerat klöverhuvuds frösättningsgrad och mängden av ett ämne. Trenden är för alla R-värden att de antyder en positiv korrelation (Tabell 2).

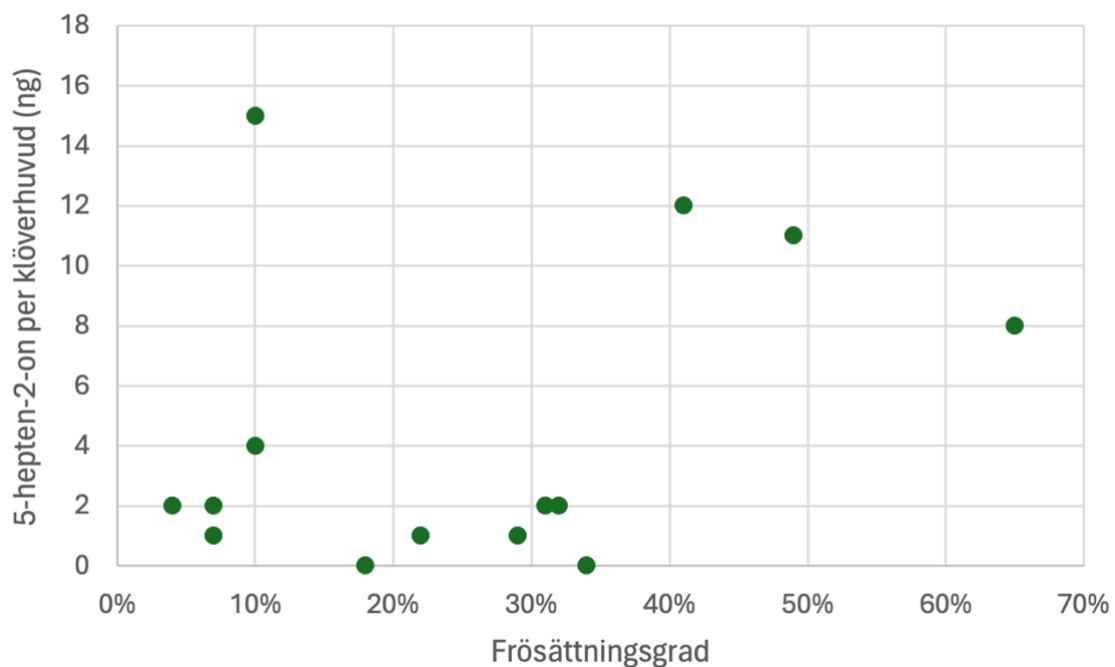
Tabell 2. Resultat av regressionsanalys av vardera doftämnes halt och frösättningsgraden hos öppet pollinerade klöverhuvuden. Multipel-R och R-kvadrat nära 1 samt ett p-värde < 0,05 tyder på korrelation.

Ämne	Multipel-R	R-kvadrat	p-värde
acetofenon	0,40	0,16	0,15
metylcinnamat 2	0,18	0,03	0,53
5-hepten-2-on	0,33	0,11	0,25
EE- α -farnesen	0,12	0,02	0,67
metylcinnamat 1	0,10	0,01	0,73
indol	0,25	0,06	0,39
2-heptanon	0,15	0,02	0,61
2-aminobensaldehyd	0,25	0,06	0,40
α -metyl-bensylalkohol	0,25	0,06	0,40
hexahydrofarnesylaceton	0,04	0,00	0,89
Z- β -Ocimen	0,03	0,00	0,92
E- β -Ocimen	0,08	0,00	0,78
karyofyllen	0,08	0,01	0,77

Ämnena vars halt är närmast att korrelera med frösättningsgraden är acetofenon och 5-hepten-2-on. I punktdiagrammen nedan ses antydning till positiv korrelation (Figur 7 och 8).



Figur 7. Punktdiagram över halten acetofenon i relation till frösättningsgraden hos öppet pollinerade klöverhuvuden. En punkt motsvarar ett klöverhuvud och värdena är baserade på medelvärden för tre klöverhuvuden.



Figur 8. Punktdiagram över halten 5-hepten-2-on i relation till frösättningsgraden hos öppet pollinerade klöverhuvuden. En punkt motsvarar ett klöverhuvud och värdena är baserade på medelvärden för tre klöverhuvuden.

4. Diskussion och slutsats

Frösättningsgraden var som förväntat signifikant högre hos klöverhuvuden som öppet pollinerats under 48 timmar, jämfört med klöverhuvuden som varit täckta. Däremot förväntades inga fröer hittas hos de täckta, men trots detta visade de en frösättningsgrad på 1%. Den oväntade frösättningen kan indikera att det inte råder total självinkompatibilitet hos rödklöversorterna i studien, och att de därmed möjligen kan självbefruktas i viss mån. Hög grad av självpollination har tidigare hittats hos tetraploid rödklöver (Jing et al. 2021a). Det förekommer samtidigt en risk att fröräkningen inte stämmer överens med den faktiska frösättningsgraden, eftersom beräkningen snarare kan sägas vara en uppskattning. Små frön kan ha missats och resultatet vore därför pålitligare ifall tid funnits till att öppna upp samtliga småblommor för att kontrollera fröförekomsten. Frösättning kan dessutom ha skett men att frön blivit uppätta, då blommor varit angripna av till exempel klöverspetsvivar vars larver livnär sig på frön (Stephansson 1998). Frösättningen behöver inte heller spegla graden av pollination då det är möjligt att inte samtliga pollinerade blommor satt frö på grund av låg fertilitet (Jing et al. 2021b).

Gällande blomdoftsämnen tycks avgivningen av de flesta undersökta ämnen i denna studie vara högre hos utslagna täckta klöverhuvuden, jämfört med hos klöverhuvuden i knoppstadiet. Resultatet indikerar även att blomdoftsavgivningen är lägre hos klöverhuvuden som öppet pollinerats under 48 timmar, jämfört med täckta huvuden. Detta tyder på att dessa blomdoftsämnen minskar i samband med pollination. Med tanke på att samtliga klöverhuvuden täcktes innan blommorna slagit ut och doftuppsamling från öppet pollinerade och täckta gjordes parallellt, utesluts att variationen vore tidsberoende. Däremot är skillnaderna enbart signifikanta gällande ett fåtal ämnen. Vidare indikerar resultatet att vissa doftämnen avges i mer konstant halt genom rödklöverhuvudets utvecklingsstadier, vilket tyder på att dessa ämnen avges från olika växtdelar, medan andra ämnen främst tycks avges från blommorna. Detta styrker resultatet av tidigare preliminära analyser³. Ämnen benämnda metylcinnamat 1 och metylcinnamat 2 har nästan identiska masspektra men hittats på olika retentionstider, varför ämnena bör vara olika isomerer av metylcinnamat. Utan publicerade retentionsindex eller användning av syntetiska standarder är det däremot oklart vilket ämne som utgör vilken isomer.

³ Mattias Larsson, universitetslektor vid Institutionen för växtskyddsbiologi, SLU Alnarp. Personlig kommunikation, 2024.

Metylcinnamat 1 och 2 är de enda doftämnen vars halt ökat signifikant från knopp till utslaget klöverhuvud, och dessutom minskat signifikant i samband med pollination. Att metylcinnamat avges i signifikant lägre halt hos öppet pollinerade rödklöverhuvuden jämfört med täckta, stämmer överens med en tidigare studie (Valentin 2022). Valentins resultat visar även signifikant lägre halt acetofenon hos öppet pollinerade blommhuvuden.

Möjligheterna att hitta signifikanta skillnader i doftämnens halt mellan behandlingarna har begränsats av att det förekom stor variation i doftavgivning mellan prover. En förklaring kan vara att det inom varje behandling ingick klöverhuvuden av olika sorter. Detta stärks av att signifikanta skillnader i halten av metylcinnamat och acetofenon har hittats mellan olika klöversorter (Valentin 2022). Sorterna gäller Vicky, Yngve och Betty, vilka även ingår i denna studie. Samtidigt var vädret under perioden för insamling mycket molnigt och regnigt, vilket tycks ha gett över lag lägre mängder producerade doftämnen jämfört med tidigare år. Väderförhållandena kan därför även vara en del i förklaringen till stor variation och bristen på signifikanta skillnader. Tidigare studier indikerar dessutom att variation i doftavgivning kan förekomma mellan blommor på samma planta (Eisern et al. 2022). Vidare kan statistikdelarna utvecklas ytterligare, då framför allt kontroll av normalfördelning hade ökat chansen att hitta signifikans.

Studien har inte kunnat påvisa någon signifikant korrelation mellan halten av ett doftämne och graden av frösättning hos öppet pollinerade blommhuvuden. Det är möjligt att en korrelation finns, men att det krävs mer detaljerade observationer för att kunna påvisa den. Viss förklaring kan finnas i tidigare nämnda påverkansfaktorer på frösättningsgrad och blomdoftsämnenas halt. I denna studie användes dessutom grupper av tre huvuden för doftuppsamling, och variation inom varje grupp kan ha dolt ett samband. Då studien även berört flera olika klöversorter med diverse genetiska och morfologiska skillnader kan det vara antagbart att sorterna även skiljer sig åt i doftavgivning i relation frösättning, inte minst mellan den diploida sorten och de tetraploida. Resultatet antydde en viss tendens till positiv korrelation mellan doftämnenas halt och graden av frösättning hos öppet pollinerade prov, det vill säga att en hög doftproduktion tycktes sammanfalla med hög frösättningsgrad. Eftersom signifikans saknas och förändringen hos enskilda individer är okänd, är det möjligt att individer med högst frösättning och doftavgivning även haft högst doftavgivning innan pollination, och därmed högre mottaglighet.

Tanken var från början att i denna studie undersöka sorterna individuellt och att göra jämförelser mellan dem. Detta genomfördes inte på grund av att det uppstod avsaknad av material och sett till lämplig omfattning av arbetet. Vid tidpunkten då materialbristen uppstod, hade redan veckors tid gått till att analysera majoriteten av materialet. Det är möjligt att det vore mer lämpligt om arbetet i ett tidigt skede avgränsats till att studera en sort eller ett fåtal sorter individuellt, trots lågt antal replikat. Med hänsyn till detta har data från sorten Betty i efterhand sammanställts

i diagram (Bilaga 4, 5 och 6). I bilagorna ses att resultatet hade blivit något annorlunda om sorten Betty undersökts enskilt. Samtidigt indikerar diagrammen att stor variation kan förekomma även inom en sort. Lågt antal prov per behandling har troligen bidragit till stor standardavvikelse. Att innefatta 10–15 replikat i vardera behandlingen anses lämpligt.

Ämnen har identifierats tentativt. För att slutgiltigt hävda identiteten hos ett ämne bör fler steg vidtas (JCE 2024). Primärt har samma ämnen jämförts, men identifieringen vore mer exakt om retentionsindex använts. Genom att analysera alkaner på samma typ av kolonn som doftämnen, kunde doftämnens retentionstid studerats relativt alkanernas. Ett annat sätt att utföra kemisk analys är att undersöka samtliga förekommande ämnen, men har inte ansetts nödvändigt och lämpligt sett till studiens syfte och lämplig omfattning. Studien har baserats på metodanalysen av Eisen et al. (2022). Syftet med att utgå från ett antal förutbestämda doftämnen har varit att undersöka skillnader utifrån kända ämnen som studerats tidigare, det vill säga att undersöka ämnens halt före och efter pollination i ett känt system. Blomdoftämnens mängd har normaliserats till nanogram, vilket gjort resultatet jämförbart med Valentins (2022). Däremot tas hänsyn till att ämnen har olika molmassa om doftämnens mängd i stället anges i SI-enheten mol. Vidare är det möjligt att analysen blivit mer noggrann om två standarder tillsatts och dessa varit bättre anpassade till ämnena för analys. Här tillsattes en enstaka intern standard av anetol, då ämnet är en aromatisk förening och dess retentionsintervall är ungefärligt med aromatiska ämnen i blomdoft, samt i förenlighet med tidigare publikationer (Friberg et al. 2014; Friberg et al. 2013; Moré et al. 2021; Svensson et al. 2005).

Syftet med undersökningen var att ta reda på om det finns ett samband mellan doftavgivning och låg fröavkastning hos rödklöver, genom att studera frösettningsgraden och utvalda doftämnens halt under klöverhuvudets olika utvecklingsstadier. Sammanfattningsvis antyder studiens resultat att avgivningen av vissa doftämnen hos rödklöver minskar i samband med pollination, även vid låg grad av frösettningsgrad. Däremot kan ingen slutsats dras kring huruvida mängden doft efter pollination har ett direkt samband med graden av frösettningsgrad, då ingen signifikant korrelation har påvisats. Studien kan däremot ge underlag för hur framtida studier kan utföras för att hitta eventuella samband. För tydligare resultat förespråkas mer detaljerade studier, där doftuppsamling görs från enstaka klöverhuvuden. Det kan även vara intressant att samla doft från samma klöverhuvud i dess olika utvecklingsstadier. Av intresse kan dessutom vara att ta hänsyn till ration mellan doftämnen. Vidare föreslås fler och kortare tidsintervall för pollination. Sannolikheten att hitta samband ökar troligen också om en rödklöversort studeras individuellt givet tillräckligt antal replikat, samt genom sortjämförelser.

Referenser

- Bommarco, R., Lundin, O., Smith, H.G., Rundlöf, M. (2012). *Drastic historic shifts in bumble-bee community composition in Sweden*. Proc R Soc B 279:309–315. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0647>
- Buttery, R.G., Kamm, J.A., Ling, L.C. (1984). *Volatile Components of Red Clover Leaves, Flowers, and Seed Pods: Possible Insect Attractants*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1984(32), 254–256. <https://doi.org/10.1021/jf00122a019>
- Eisen, E.K., Powers, M.J., Raguso, A.R., Campbell, R.D. (2022). *An analytical pipeline to support robust research on the ecology, evolution, and function of floral volatiles*. Front. Ecol. Evol. 10:1006416. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.1006416>
- Friberg, M., Schwind, C., Roark, C.L., Raguso, A.R., Thompson, N.J. (2014). *Floral Scent Contributes to Interaction Specificity in Coevolving Plants and Their Insect Pollinators*. J Chem Ecol 40:955-965. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0497-y>
- Friberg, M., Schwind, C., Raguso, A.R., Thomson, N.J. (2013). *Extreme divergence in floral scent among woodland star species (*Lithophragma* spp.) pollinated by floral parasites*. Annals of Botany 11: 539-550. <https://doi.org/10.1093/aob/mct007>
- Hederström, V. (2019). *Ecology of pollinators, pests and natural enemies in agricultural landscapes – ensuring a sustainable supply of clover seeds*. Diss. Department of Plant Protection Biology, Swedish University of Agricultural Sciences. https://pub.epsilon.slu.se/16044/7/hederstrom_v_190402.pdf [2024-05-11]
- Hederström, V., Rundlöf, M., Birgersson, G., Larsson, M., C., Balkenius, A., Lankinen, Å. (2021). *Do plant ploidy and pollinator tongue length interact to cause low seed yield in red clover?* Ecosphere 12: e03416. <https://res.slu.se/id/publ/111833>

- Jing, S., Kryger, P., Boelt, B. (2021a). *Review of seed yield components and pollination conditions in red clover (*Trifolium pratense* L.) seed production*. *Euphytica* 2017:69. <https://doi.org/10.1007/s10681-021-02793-0>
- Jing, S., Kryger, P., Boelt, B. (2021b). *Different pollination approaches to compare the seed set of diploid and tetraploid red clover *Trifolium pratense* L.* *Nordic Journal of Botany* 2021: e03006. <https://doi.org/10.1111/njb.03006>
- Jing, S., Kryger, P., Markussen, B., Boelt, B. (2021c) *Pollination and Plant Reproductive Success of Two Ploidy Levels in Red Clover (*Trifolium pratense* L.)*. *Front. Plant Sci.* 12:720069. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.720069>
- Journal of Chemical Ecology (2024). *Submission guidelines*. <https://link.springer.com/journal/10886/submission-guidelines> [2024-06-01].
- Lankinen, Å. & Öhlund, L. (2013). *Forskning om pollens kvalitet som hjälpmedel för att förbättra avkastningen i rödklöverfröodlingen*. [Faktablad]. LTJ-fakultetens faktablad 2013:10. SLU Alnarp. https://pub.epsilon.slu.se/10811/1/Lankinen_A_130923.pdf [2024-02-08]
- Larsson, M. C., Madjidian, J. A., Lankinen, Å. (2021). *Floral scent and pollinator visitation in relation to floral colour morph in the mixed-mating annual herb *Collinsia heterophylla**. *Nordic Journal of Botany* 39: e03025. <https://doi.org/10.1111/njb.03025>
- Lüscher, A., Mueller-Harvey, I., Soussana, J.F., Rees, R.M., Peyraud, J.L. (2014). *Potential of legume-based grassland-livestock systems in Europe: a review*. *Grass Forage Sci* 69:206–228. <https://doi.org/10.1111/gfs.12124>
- Molander, M. A., Eriksson, B., Arriola, K., Richards, A. B., Hanks, L. M., Larsson, M. C., Millar, J. G. (2022). *p-Mentha-1,3-dien-9-ol: A novel aggregation-sex pheromone for monitoring longhorn beetles (*Cerambycidae*) in Eurasia and North America*. *Journal of Applied Entomology* 146: 1098–1108. <https://doi.org/10.1111/jen.13059>
- Moré, M., Soteras, F., Ibañez, C.A., Dötterl, S., Coccuci, A.A., Raguso, A.R. (2021). *Floral Scent Evolution in the Genus *Jaborosa* (Solanaceae): Influence of Ecological and Environmental Factors*. *Plants* 10:1512. <https://doi.org/10.3390/plants10081512>

- Naturvårdsverket (2023). *Klimatet och jordbruket*.
<https://www.naturvardsverket.se/amnesomraden/klimatomstallningen/omraden/klimatet-och-jordbruket/> [2024-05-11]
- Raguso, R.A. (2008). *Wake Up and Smell the Roses: the Ecology and Evolution of Floral Scent*. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 39:549–569.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095601>
- Raguso, R.A. & Pellmyr, O. (1998). *Dynamic Headspace Analysis of Floral Volatiles: A Comparison of Methods*. *Oikos* 81:2.
<https://doi.org/10.2307/3547045>
- Rodriguez-Saona, C., Parra, L., Quiroz, A., Isaacs, R. (2011). *Variation in highbush blueberry floral volatile profiles as a function of pollination status, cultivar, time of day and flower part: implications for flower visitation by bees*. *Ann. Bot.* 107:1377–1390.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcr077>
- SLU Grogrund (2023a). *Genomisk selektion i rödklöver*.
<https://www.slu.se/centrumbildningar-och-projekt/grogrund/projekt/genomisk-selektion-i-rodklover/> [2024-02-08]
- SLU Grogrund (2023b). *Växtförädling för ökad fröavkastning hos rödklöver*.
<https://www.slu.se/centrumbildningar-och-projekt/grogrund/projekt/vaxtforadling-for-okad-froavkastning-hos-rodklover/> [2024-02-08]
- Stephansson, D. (1998). *Klöverpetsvivar och några andra skadedjur på klöver*. [Faktablad]. Faktablad Om Växtskydd, Jordbruk 86 J. Institutionen för entomologi, Sveriges lantbruksuniversitet.
https://pub.epsilon.slu.se/4935/1/Faktablad_om_vaxtskydd_86J.pdf [2024-05-11]
- Sundahl, D. A. (2015). *Pollinatörer i klöver – Vilka pollinatörer finns det och hur kan vi öka pollineringen?* Sveriges lantbruksuniversitet. Institutionen för biosystem och teknologi/Lantmästare – kandidatprogram.
https://stud.epsilon.slu.se/8715/1/douhan_sundahl_a_151229.pdf [2024-05-11]
- Svensson, P.G., Hickman, Jr.O.M., Bartram, S., Boland, W., Pellmyr, O., Raguso, A.R. (2005). *Chemistry and Geographic Variation of Floral Scent in Yucca Filamentosa (Agavaceae)*. *American Journal of Botany* 92(10): 1624-1633. <https://www.jstor.org/stable/4126171>

Valentin, I. (2022). *Tetraploid and diploid differences in red clover (Trifolium pratense L.) – A study on seed production, pollinators across regions and landscapes, and floral scent*. Swedish University of Agricultural Sciences. Department of Plant Protection Biology/Horticultural Science – master's programme. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:slu:epsilon-s-18559>

Tack

Tack till Marina Emelianova för produktion och insamling av doftprover och blomhuvuden som ligger till grund för denna studie, samt för handledning i doftanalys och fröräkning. Tack till Kajsa Svensson för instruktioner och hjälplighet vid fröräkningen, samt till Mattias Larsson och Åsa Lankinen för stort engagemang och gott handledarskap. Ytterligare tack till samtliga för tidigare och pågående studier inom ämnet.

Bilaga 1. Täckta klöverhuvuden

1	Collection date	Site	Cultivar	Sample name	Treatment
2	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Betty	B1B_A	Unpollinated
3	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Betty	B1B_B	Unpollinated
4	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Betty	B1B_C	Unpollinated
5	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Yngve	Y1B_A	Unpollinated
6	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Yngve	Y1B_B	Unpollinated
7	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Holly	H1B_A	Unpollinated
8	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Holly	H1B_B	Unpollinated
9	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Holly	H1B_C	Unpollinated
10	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Vicky	V1B_A	Unpollinated
11	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Vicky	V1B_B	Unpollinated
12	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Vicky	V1B_C	Unpollinated
13	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Peggy	P1B_A	Unpollinated
14	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Peggy	P1B_B	Unpollinated
15	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Peggy	P1B_C	Unpollinated
16	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Betty	B2B_A	Unpollinated
17	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Betty	B2B_B	Unpollinated
18	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Betty	B2B_C	Unpollinated
19	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Yngve	Y2B_A	Unpollinated
20	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Yngve	Y2B_B	Unpollinated
21	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Yngve	Y2B_C	Unpollinated
22	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Holly	H2B_A	Unpollinated
23	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Holly	H2B_B	Unpollinated
24	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Holly	H2B_C	Unpollinated
25	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Vicky	V2B_A	Unpollinated
26	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Vicky	V2B_B	Unpollinated
27	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Vicky	V2B_C	Unpollinated
28	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Peggy	P2B_A	Unpollinated
29	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Peggy	P2B_B	Unpollinated
30	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslabbet	Peggy	P2B_C	Unpollinated
31	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslabbet	Betty	B3B_A	Unpollinated
32	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslabbet	Yngve	Y3B_1_A	Unpollinated
33	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslabbet	Yngve	Y3B_1_B	Unpollinated
34	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslabbet	Yngve	Y3B_1_C	Unpollinated
35	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslabbet	Holly	H3B_A	Unpollinated
36	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslabbet	Holly	H3B_B	Unpollinated
37	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslabbet	Holly	H3B_C	Unpollinated
38	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslabbet	Vicky	V3B_A	Unpollinated
39	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslabbet	Vicky	V3B_B	Unpollinated
40	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslabbet	Vicky	V3B_C	Unpollinated
41	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslabbet	Peggy	P3B_A	Unpollinated
42	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslabbet	Peggy	P3B_B	Unpollinated
43	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslabbet	Peggy	P3B_C	Unpollinated

Bilaga 2. Öppet pollinerade klöverhuvuden

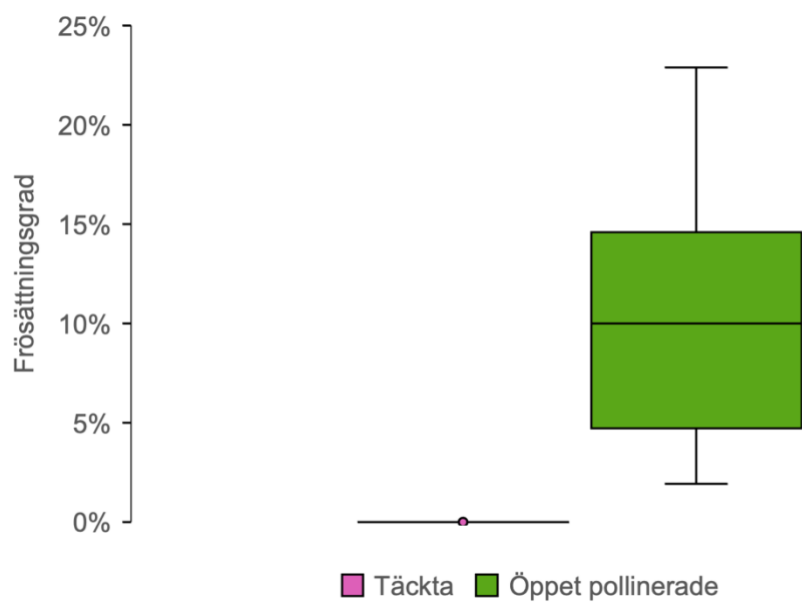
1	Collection date	Site	Cultivar	Sample name	Treatment
2	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Betty	B1P_A	Pollinated 48 h
3	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Betty	B1P_B	Pollinated 48 h
4	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Betty	B1P_C	Pollinated 48 h
5	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Yngve	Y1P_A	Pollinated 48 h
6	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Yngve	Y1P_B	Pollinated 48 h
7	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Yngve	Y1P_C	Pollinated 48 h
8	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Holly	H1P_A	Pollinated 48 h
9	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Holly	H1P_B	Pollinated 48 h
10	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Holly	H1P_C	Pollinated 48 h
11	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Vicky	V1P_A	Pollinated 48 h
12	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Vicky	V1P_B	Pollinated 48 h
13	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Vicky	V1P_C	Pollinated 48 h
14	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Peggy	P1P_A	Pollinated 48 h
15	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Peggy	P1P_B	Pollinated 48 h
16	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Peggy	P1P_C	Pollinated 48 h
17	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Betty	B2P_A	Pollinated 48 h
18	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Betty	B2P_B	Pollinated 48 h
19	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Betty	B2P_C	Pollinated 48 h
20	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Yngve	Y2P_A	Pollinated 48 h
21	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Yngve	Y2P_B	Pollinated 48 h
22	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Yngve	Y2P_C	Pollinated 48 h
23	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Holly	H2P_A	Pollinated 48 h
24	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Holly	H2P_B	Pollinated 48 h
25	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Holly	H2P_C	Pollinated 48 h
26	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Vicky	V2P_A	Pollinated 48 h
27	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Vicky	V2P_B	Pollinated 48 h
28	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Vicky	V2P_C	Pollinated 48 h
29	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Peggy	P2P_A	Pollinated 48 h
30	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Peggy	P2P_B	Pollinated 48 h
31	2023-09-04	Alnarp, trädgårdslandet	Peggy	P2P_C	Pollinated 48 h
32	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslandet	Betty	B3P_A	Pollinated 48 h
33	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslandet	Betty	B3P_B	Pollinated 48 h
34	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslandet	Betty	B3P_C	Pollinated 48 h
35	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslandet	Yngve	Y3P_1_A	Pollinated 48 h
36	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslandet	Yngve	Y3P_1_B	Pollinated 48 h
37	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslandet	Yngve	Y3P_1_C	Pollinated 48 h
38	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslandet	Holly	H3P_A	Pollinated 48 h
39	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslandet	Holly	H3P_B	Pollinated 48 h
40	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslandet	Holly	H3P_C	Pollinated 48 h
41	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslandet	Vicky	V3P_A	Pollinated 48 h
42	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslandet	Vicky	V3P_B	Pollinated 48 h
43	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslandet	Vicky	V3P_C	Pollinated 48 h
44	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslandet	Peggy	P3P_A	Pollinated 48 h
45	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslandet	Peggy	P3P_B	Pollinated 48 h
46	2023-08-14	Alnarp, trädgårdslandet	Peggy	P3P_C	Pollinated 48 h

Bilaga 3. Doftprover

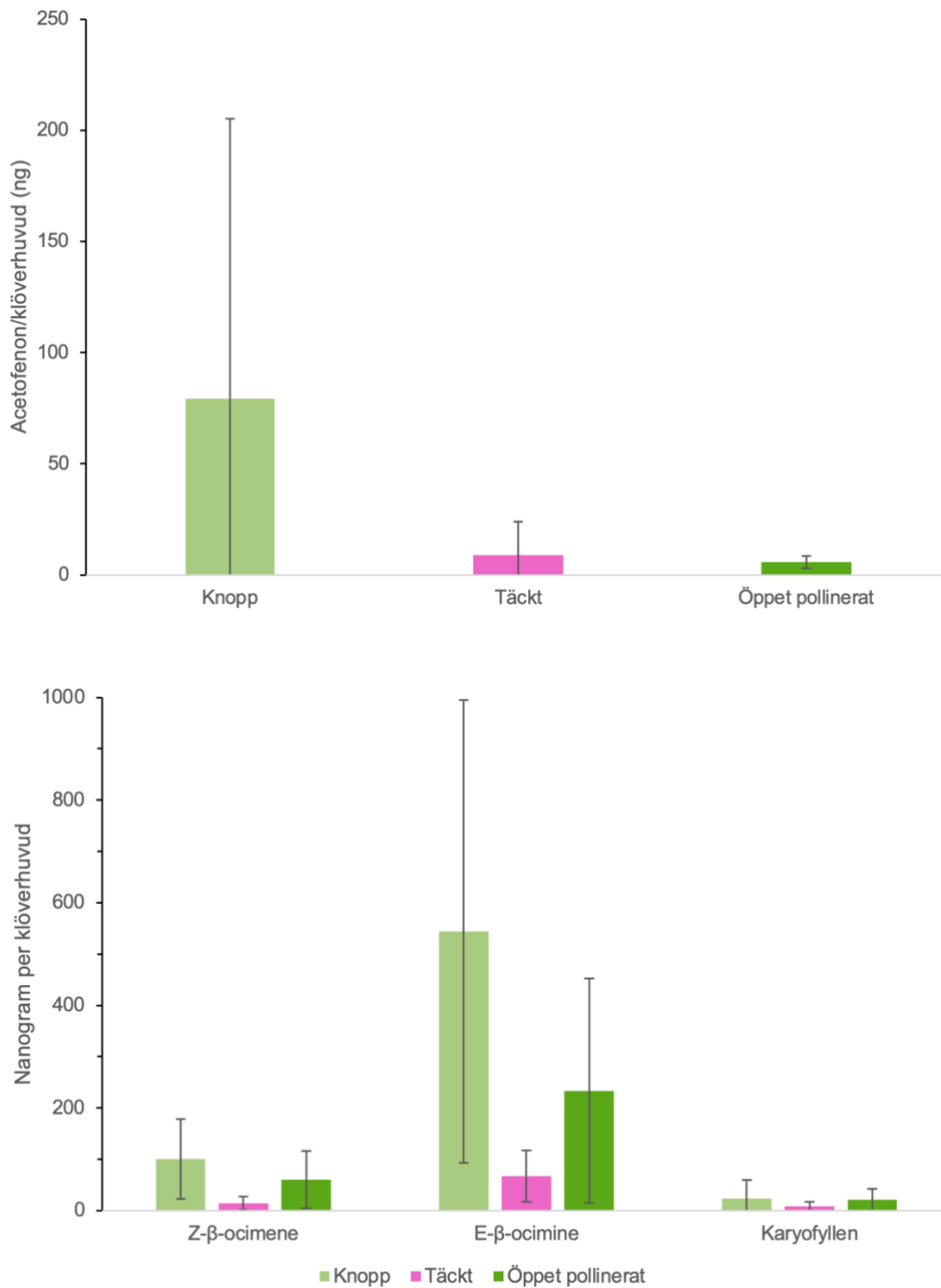
1	Experiment	Cultivar	Replication	Date of sample collection	Stage	Number of flowers in 1 sample	Sample name	File name
2	SE	Betty	1	2023-09-04	Bud	3	B1K	ML2_2023_140_KajsaMClover01_B1K.D
3	SE	Betty	1	2023-09-04	Unpollinated flower	3	B1B	ML2_2023_141_KajsaMClover01_B1B.D
4	SE	Betty	1	2023-09-04	Pollinated_48h	3	B1P	ML2_2023_143_KajsaMClover03_B1P.D
5	SE	Yngve	1	2023-09-04	Bud	3	Y1K	ML2_2023_146_KajsaMClover04_Y1K.D
6	SE	Yngve	1	2023-09-04	Unpollinated flower	2	Y1B	ML2_2023_147_KajsaMClover05_Y1B_2 heads.D
7	SE	Yngve	1	2023-09-04	Pollinated_48h	3	Y1P	ML2_2023_148_KajsaMClover06_Y1P.D
8	SE	Holly	1	2023-09-04	Bud	3	H1K	ML2_2023_182_KajsaMClover13_H1K.D
9	SE	Holly	1	2023-09-04	Unpollinated flower	3	H1B	ML2_2023_183_KajsaMClover14_H1B.D
10	SE	Holly	1	2023-09-04	Pollinated_48h	3	H1P	ML2_2023_184_KajsaMClover15_H1P.D
11	SE	Vicky	1	2023-09-04	Bud	3	V1K	ML2_2023_152_KajsaMClover10_V1K.D
12	SE	Vicky	1	2023-09-04	Unpollinated flower	3	V1B	ML2_2023_181_KajsaMClover12_V1B.D
13	SE	Vicky	1	2023-09-04	Pollinated_48h	3	V1P	ML2_2023_153_KajsaMClover11_V1P.D
14	SE	Peggy	1	2023-09-04	Bud	3	P1K	ML2_2023_149_KajsaMClover07_P1K.D
15	SE	Peggy	1	2023-09-04	Unpollinated flower	3	P1B	ML2_2023_151_KajsaMClover09_P1B.D
16	SE	Peggy	1	2023-09-04	Pollinated_48h	3	P1P	ML2_2023_150_KajsaMClover08_P1P_lostfilter.D
17	SE	Betty	2	2023-09-04	Bud	3	B2K	ML2_2023_196_KajsaMClover25_B2K.D
18	SE	Betty	2	2023-09-04	Unpollinated flower	3	B2B	ML2_2023_197_KajsaMClover26_B2B.D
19	SE	Betty	2	2023-09-04	Pollinated_48h	3	B2P	ML2_2023_198_KajsaMClover27_B2P.D
20	SE	Yngve	2	2023-09-04	Bud	3	Y2K	ML2_2023_190_KajsaMClover19_Y2K.D
21	SE	Yngve	2	2023-09-04	Unpollinated flower	3	Y2B	ML2_2023_191_KajsaMClover20_Y2B.D
22	SE	Yngve	2	2023-09-04	Pollinated_48h	3	Y2P	ML2_2023_192_KajsaMClover21_Y2P.D
23	SE	Holly	2	2023-09-04	Bud	3	H2K	ML2_2023_193_KajsaMClover22_H2K.D
24	SE	Holly	2	2023-09-04	Unpollinated flower	3	H2B	ML2_2023_194_KajsaMClover23_H2B.D
25	SE	Holly	2	2023-09-04	Pollinated_48h	3	H2P	ML2_2023_195_KajsaMClover24_H2Past.D
26	SE	Vicky	2	2023-09-04	Bud	3	V2K	ML2_2023_187_KajsaMClover16_V2K.D
27	SE	Vicky	2	2023-09-04	Unpollinated flower	3	V2B	ML2_2023_188_KajsaMClover17_V2B.D
28	SE	Vicky	2	2023-09-04	Pollinated_48h	3	V2P	ML2_2023_189_KajsaMClover18_V2P.D
29	SE	Peggy	2	2023-09-04	Bud	3	P2K	ML2_2023_199_KajsaMClover28_P2K.D
30	SE	Peggy	2	2023-09-04	Unpollinated flower	3	P2B	ML2_2023_200_KajsaMClover29_P2B.D
31	SE	Peggy	2	2023-09-04	Pollinated_48h	3	P2P	ML2_2023_201_KajsaMClover30_P2P.D
32	SE	Betty	3	2023-08-14	Bud	3	B3K	ML2_2024_023_KajsaMClover34B3K.D
33	SE	Betty	3	2023-08-14	Unpollinated flower	3	B3B	ML2_2024_024_KajsaMClover35B3B.D
34	SE	Betty	3	2023-08-14	Pollinated_48h	3	B3P	ML2_2024_025_KajsaMClover36B3P.D
35	SE	Yngve	3	2023-08-14	Bud	3	Y3K_1_smth	ML2_2024_034_KajsaMClover43Y3K_1_smth.D
36	SE	Yngve	3	2023-08-14	Unpollinated flower	3	Y3B_1	ML2_2024_035_KajsaMClover44Y3B_1.D
37	SE	Yngve	3	2023-08-14	Pollinated_48h	3	Y3P_1	ML2_2024_036_KajsaMClover45Y3P_1.D
38	SE	Holly	3	2023-08-14	Bud	3	H3K	ML2_2024_020_KajsaMClover31H3K.D
39	SE	Holly	3	2023-08-14	Unpollinated flower	3	H3B	ML2_2024_021_KajsaMClover32H3B.D
40	SE	Holly	3	2023-08-14	Pollinated_48h	3	H3P	ML2_2024_022_KajsaMClover33H3P.D
41	SE	Peggy	3	2023-08-14	Bud	3	P3K	ML2_2024_031_KajsaMClover40P3K.D
42	SE	Peggy	3	2023-08-14	Unpollinated flower	3	P3B	ML2_2024_032_KajsaMClover41P3B.D
43	SE	Peggy	3	2023-08-14	Pollinated_48h	3	P3P	ML2_2024_033_KajsaMClover42P3P.D
44	SE	Vicky	3	2023-08-14	Bud	3	V3K	ML2_2024_026_KajsaMClover37V3K.D
45	SE	Vicky	3	2023-08-14	Unpollinated flower	3	V3B	ML2_2024_027_KajsaMClover38V3B.D
46	SE	Vicky	3	2023-08-14	Pollinated_48h	3	V3P	ML2_2024_028_KajsaMClover39V3P.D

Bilaga 4. Frösättningsgrad Betty. n=9.

För klöverhuvuden av sorten Betty är frösättningsgraden 0% för täckta och 10% för öppet pollinerade. Ett t-test ger p-värdet 0,0005, vilket är en signifikant skillnad. n=9.



Bilaga 5. Blomdoftsämnen Betty. n=3



Bilaga 6. Blomdoftsämnen Betty. n=3.

