

Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri

**Danmarks JordbrugsForskning
Forskningscenter Flakkebjerg
Afdeling for Plantebeskyttelse**



Slutrapport

Til
Kartoffelafgiftsfonden
2003

Projektet

Biologisk bekæmpelse af pulverskurv for at hindre
spredning af kartoffelmop-topvirus med læggeknolde

Slutrapport 2002 for KAF-projektet: Biologisk bekæmpelse af pulverskurv for at hindre spredning af kartoffelmop-topvirus med læggeknolde

Steen Lykke Nielsen og John Larsen, Danmarks JordbrugsForskning , Forskningscenter Flakkebjerg, 4200 Slagelse

Konklusion

To mikrobiologiske midler: TRI 002 og Binab TF har givet en signifikant reduktion af infektion med pulverskurv i rødder af tomat, når midlerne blev blandet i jord sammen med pulverskurv-hvilesporer. Det er første gang, det er påvist, at det er muligt at bekæmpe pulverskurv med mikrobiologiske midler. Resultatet åbner for perspektivet, at det kan blive muligt direkte at bekæmpe kartoffelmop-topvirus.

Baggrund

Projektets formål er at undersøge effekten af kommercielle mikrobiologiske midler på pulverskurv med henblik på at hindre eller reducere spredning af mop-top virus med læggeknolde gennem bejdsning af knolde med de mikrobiologiske midler. Baggrunden for projektet er beskrevet i detaljer i ansøgningen. Den går i korthed ud på, at der foreligger publicerede undersøgelser, der har vist, at der er opnået en god bekæmpelse af en slimsvamp, som er tæt beslægtet med pulverskurv, med svampen *Trichoderma harzianum*, som indgår i mange mikrobiologiske bekæmpelsesmidler. I nærværende projekt er seks markedsførte mikrobiologiske bekæmpelsesmidlers og en mykorrhiza-dannende svamps effekt afprøvet overfor hvilesporer af pulverskurv opblandet i jord. Den mykorrhiza-dannende svamp blev medtaget, fordi det i andre undersøgelser har vist sig, at etablering af en mykorrhiza-dannende svamp i rødder af planter kan have en beskyttende effekt over for efterfølgende infektion af patogene svampe.

Såfremt nogle af midlerne er effektive, vil der være basis for videre undersøgelse af disse midler, bl.a. undersøgelse af midlernes virkning under forskellige infektionstryk af pulverskurv, og om det er muligt at fremme etableringen og væksten af den mikrobiologiske organisme, ved at give det en ”madpakke” med i form af et næringssubstrat. Den næste fase vil være at afprøve midlet som knoldbejdsning og undersøge virkningen på spredning af pulverskurv og af mop-top med virus-inficeret pulverskurv.

Metoder og resultater

Inokulum af pulverskurv blev fremskaffet i form af et parti Asparges-kartofler stærkt angrebet af pulverskurv. Pulverskurvlæsionerne blev skåret af knoldene, tørret og homogeniseret.

Fase 1 - Optimering af patosystem.

Betydningen af dosering af inokulum (10, 50 og 100 mg per 100 ml potte) og vandindhold (65 og 95 % af markkapaciteten) i voksemediet blev undersøgt ved at iblande pulverskurv-inokulum i en steril (strålebehandlet) jordblanding og opgøre infektionen af tomatrødder med pulverskurv efter 4 ugers vækst ved jordtemperatur på 14 °C og lufttemperatur på 20 °C. Hver behandling bestod af 6 gentagelser (potter). Resultaterne fremgår af Tabel 1.

Tabel 1. Kolonisering af tomatrødder med pulverskurv-sporangier, vægt af top og rod og rodlængde angivet for forskellige kombinationer af mængde inokulum og vandmætning af voksemediet. Resultaterne af hver behandling er gennemsnittet af 6 potter.

Behandling	Kolonise- ring	Top	Top	Top	Rod	Rod
		friskvægt g	tørvægt g	tørvægt %	frisk- vægt g	længde cm
0 mg pulverskurv, 65% vand	0	4,43	0,61	13,8	2,11	16321
10 mg pulverskurv, 65% vand	42	3,54	0,51	14,4	1,69	12180
50 mg pulverskurv, 65% vand	47	2,17	0,33	15,2	1,13	8211
100 mg pulverskurv, 65% vand	25	3,00	0,41	13,7	1,19	8089
0 mg pulverskurv, 95% vand	0	2,67	0,34	12,7	1,22	12838
10 mg pulverskurv, 95% vand	29	1,73	0,23	13,3	0,6	4345
50 mg pulverskurv, 95% vand	33	1,09	0,14	12,8	0,32	2466
100 mg pulverskurv, 95% vand	33	0,93	0,12	12,9	0,27	2603

På baggrund af resultaterne i Tabel 1 blev det besluttet at benytte 50 mg inokulum og 65% vandmætning i de efterfølgende forsøg, idet denne kombination sikrer en høj infektionsrate og en rimelig plantevækst.

Fase 2 - Screening af mikrobiologiske midlers effekter over for udvikling af pulverskurv.

De mikrobiologiske midler blev, sammen med pulverskurv-inokulum, iblandet en steril (strålebehandlet) jordblanding, og der blev efterfølgende priklet en tomatplante i hver potte. Hver behandling bestod af 6 gentagelser (potter). Planterne blev dyrket i væksthuse på et specielt bord, hvor jordtemperaturen blev holdt konstant på 14 °C, mens lufttemperaturen var på 20 °C, og med højere temperatur ved solskin. Der blev anvendt den dosering af de mikrobiologiske midler, som blev anbefalet af firmaet. Efter 4 ugers vækst blev planterne høstet, og der blev for hver plante opgjort top frisk- og tørvægt, rod friskvægt, rodlængde og infektion (kolonisering) af rødder med pulverskurv. Forsøget blev gentaget to gange.

De mikrobiologiske midler og den mykorrhiza-dannende svamp, der indgik i forsøgene, fremgår af Tabel 2.

Tabel 2. Mikrobiologiske midler afprøvet.

Produkt	Organisme	Type organisme
Bacillus subtilis	<i>Bacillus subtilis</i>	Bakterie
Mycostop	<i>Streptomyces sp.</i>	Strålesvamp (en bakterie)
Supresivit	<i>Trichoderma harzianum</i>	Svamp
Binap TF	<i>Trichoderma harzianum</i>	Svamp
TRI 002	<i>Trichoderma harzianum</i>	Svamp
TRI 003	<i>Trichoderma harzianum</i>	Svamp
Glomus intraradices	<i>Glomus intraradices</i>	Mykorrhiza-svamp

Det var ikke muligt at fremskaffe midler med svampen *Gliocladium sp.* og bakterien *Pseudomonas chloraraphis*, som beskrevet i ansøgningen. I stedet blev strålesvampen (en bakterie) *Streptomyces* medtaget i form af midlet Mycostop og den mykorrhiza-dannende svamp *Glomus intraradices*.

Det var ikke muligt at medtage alle midler samtidigt, hvilket bevirkede, at der blev udført i alt tre forsøgsrunder. Resultatet af hver forsøgsrunde skal vurderes separat.

Mykorrhiza-dannende svampe etablerer sig meget dårligt i planterødder ved højt fosforindhold i jorden. Derfor blev forsøgsleddet med mykorrhiza-svampen udført i jord med lavt fosforindhold. I det første forsøg blev der ikke medtaget en kontrol med pulverskurv i jord med lavt fosforindhold, men det blev der i de to følgende forsøg.

Efter vejning af den høstede rod blev den klippet i 1 cm stykker og farvet med trypanblåt og lagt i glycerol. Opgørelse for kolonisering blev gjort ved for hver prøve at udtage 10 tilfældige rodstykker af ca. 1 cm længde og placere dem parallelt på et objektglas og for hvert rodstykke på ti tilfældige

steder at observere, om en vandret streg gennem synsfeltet skar et sporangium af pulverskurv eller ej. Dvs. der blev gjort i alt 100 observationer pr. rodprøve.

Resultaterne af de tre forsøgs fremgår af Tabel 3, 4 og 5.

Tabel 3. Kolonisering af tomatrødder med pulverskurv-sporangier angivet for tre forsøg. Resultaterne af hver behandling er gennemsnittet af 6 potter.

Forsøgsled	Forsøg juli 02	Forsøg nov. 02	Forsøg jan. 03
Pulverskurv 50 mg	36	39	8
Pulverskurv 50 mg, Bacillus subtilis 100 mg	34	21	-
Pulverskurv 50 mg, Supresivit 100 mg	32	35	-
Pulverskurv 50 mg, Mycostop 100 mg	35	29	-
Pulverskurv 50 mg, Tri 002 88 mg	-	19	1
Pulverskurv 50 mg, Tri 003, 70 mg	-	42	5
Pulverskurv 50 mg, Binab TF 22 mg	-	26	2
Kontrol ren jord	0	1	0
*LSD _{0.05}	16,3	12,1	5,6
Pulverskurv 50 mg, lavt fosfor	-	39	6
Pulverskurv 50 mg, G. intraradices 25g, lavt fosfor	19	30	5
G. intraradices 25 g, lavt fosfor	0	2	0
Kontrol ren jord med lavt fosfor	-	4	1
LSD _{0.05}		10,3	5,3

-: Forsøgsleddet er ikke indgået i det pågældende forsøg. *LSD_{0,05} er mindste signifikante forskel på 5%-niveau.

Resultaterne for kolonisering i Tabel 3 viser, at infektionsgraden med pulverskurv i forsøget i januar 2003 var meget lavere end i de to forgående forsøg. Årsagen til dette kendes ikke. I kontrollerne med ren jord og med ren *Glomus intraradices* forekommer der i nogle tilfælde en lav forekomst af pulverskurv. Det er ikke klarlagt, hvordan denne kontaminering er sket. TRI 002 og Binab F giver en signifikant (5%-niveau) reduktion af kolonisering af pulverskurv i begge forsøg. Bacillus subtilis giver en signifikant reduktion af koloniseringen i det ene (nov. 02) af de to forsøg. Mykorrhizasvampen *Glomus intraradices* reducerer ikke angrebet af pulverskurv signifikant.

Tabel 4. Top friskvægt og top tørstofprocent angivet for tre forsøg.

Forsøgsled	Top friskvægt g			Top tørvægt %		
	Juli 02	Nov. 02	Jan. 03	Juli 02	Nov. 02	Jan. 03
Pulverskurv 50 mg	1,88	7,40	5,59	13,3	10,8	10,3
Pulverskurv 50 mg, Bacillus subtilis 100 mg	1,70	5,26	-	13,6	10,2	-
Pulverskurv 50 mg, Supresivit 100 mg	2,53	6,88	-	13,3	11,0	-
Pulverskurv 50 mg, Mycostop 100 mg	2,39	7,76	-	14,5	10,6	-
Pulverskurv 50 mg, Tri 002, 88 mg	-	6,60	7,65	-	11,7	10,0
Pulverskurv 50 mg, Tri 003, 70 mg	-	6,57	5,76	-	11,0	10,8
Pulverskurv 50 mg, Binab TF 22 mg	-	6,61	7,19	-	10,8	10,6
Kontrol ren jord	3,34	12,57	19,01	14,7	9,7	9,1
*LSD _{0,05}	0,44	1,19	1,39			
Pulverskurv 50 mg, lavt fosfor	-	1,14	0,99	-	7,8	10,7
Pulverskurv 50 mg, G. intraradices 25g, lavt fosfor	0,82	1,52	0,92	13,0	11,8	12,0
G. intraradices 25 g, lavt fosfor	1,31	6,67	6,43	14,1	7,9	10,1
Kontrol ren jord med lavt fosfor	-	8,73	9,76	-	9,4	10,2
LSD _{0,05}		0,46	0,95			

-: Forsøgsleddet er ikke indgået i det pågældende forsøg. *LSD_{0,05} er mindste signifikante forskel på 5%-niveau.

Tabel 5. Rod friskvægt og rodlængde angivet for tre forsøg.

Forsøgsled	Rod friskvægt g			Rodlængde cm		
	Juli 02	Nov. 02	Jan. 03	Juli 02	Nov. 02	Jan. 03
Pulverskurv 50 mg	0,41	1,92	1,42	1764	3451	2730
Pulverskurv 50 mg, Bacillus subtilis 100 mg	0,35	1,53	-	1266	3586	-
Pulverskurv 50 mg, Supresivit 100 mg	0,40	2,37	-	1563	5507	-
Pulverskurv 50 mg, Mycostop 100 mg	0,52	2,50	-	1844	5894	-
Pulverskurv 50 mg, Tri 002, 88 mg	-	1,95	1,81	-	4594	5794
Pulverskurv 50 mg, Tri 003, 70 mg	-	1,96	1,14	-	4013	2050
Pulverskurv 50 mg, Binab TF 22 mg	-	1,91	1,72	-	3573	4101
Kontrol ren jord	0,87	2,99	3,44	3121	9064	7517
*LSD _{0,05}	0,16	0,49	0,46	NS	1559	2228
Pulverskurv 50 mg, lavt fosfor	-	0,23	0,36	-	583	865
Pulverskurv 50 mg, G. intraradices 25g, lavt fosfor	0,23	0,52	0,29		1129	684
G. intraradices 25 g, lavt fosfor	0,46	1,61	1,93	-	5871	9564
Kontrol ren jord med lavt fosfor	-	2,55	2,19	-	7088	8758
LSD _{0,05}		0,24	0,41		1627	1746

-: Forsøgsleddet er ikke indgået i det pågældende forsøg. *LSD_{0,05} er mindste signifikante forskel på 5%-niveau.

Infektion af pulverskurv gav i alle forsøg en signifikant reduktion af friskvægten af top og rod og af rodlængden i forhold til de sunde kontroller. Pulverskurvinfektionen influerede derimod ikke på toppens tørstofprocent. Nogle af de mikrobiologiske midler gav i enkelte forsøg en signifikant forøgelse af toppens friskvægt: Supresivit og Mycostop i juli 02 og TRI 002 og Binab TF i januar 03. Alene Mycostop gav en signifikant øget rodfriskvægt i et enkelt forsøg i november 02, og Mycostop og Supresivit gav en signifikant øget rodlængde i et enkelt forsøg i november 02 og TRI02 i forsøget i januar 03. I alle tilfælde set i forhold til ren forekomst af pulverskurv.

Tilsætning af mykorrhiza-svampen *Glomus intraradices* alene til steril jord gav i begge forsøg en signifikant reduktion af top-friskvægten og i ét af forsøgene også en signifikant reduktion af rodfriskvægten, mens det ikke influerede på rodlængden.

Analyse af de mikrobiologiske midler.

Mængde levende enheder af et mikrobiologisk middel angives som CFU, som står for "colony forming units", hvilket angiver, hvor mange levedygtige sporer af en svamp eller bakterie, som er til stede i produktet eller i jorden. I projektet blev CFU målt for de *Trichoderma*-holdige midler. Det var ikke muligt at fremskaffe selektive voksemedier for bakterierne *Bacillus subtilis* og *Streptomy-*

ces. Analyserne blev foretaget på de kommercielle produkter og på jordprøver, som blev udtaget fra forsøget november 02 ved forsøgets afslutning. Resultaterne fremgår af Tabel 6.

Tabel 6. Antal Colony Forming Units (CFU) per gram i 4 kommercielle *Trichoderma*-produkter og i jord udtaget fra forsøg november 02 ved forsøgets afslutning.

Produkt	CFU/g i det kommer- cielle produkt	CFU/g i jord fra forsøg november 02
Supresivit	$3,4 \times 10^9$	$2,6 \times 10^4$
TRI 02	$2,8 \times 10^7$	$1,6 \times 10^5$
TRI 03	$3,1 \times 10^4$	$1,8 \times 10^5$
Binab TF	$2,1 \times 10^6$	$6,9 \times 10^4$

Resultaterne af analysen af de kommercielle produkter viser, at der var mange levende enheder i dem. CFU-værdierne fra jordanalyserne viser, at en manglende effekt af produktet ikke skyldes, at der ikke var levende produkt til stede i jorden.

Diskussion

Kontamineringen af nogle af de sunde kontroller har ingen indflydelse på resultatet. Det er første gang, at vi har udført denne type forsøg med pulverskurv, så det har givet den erfaring til fremtidige forsøg, at der let sker kontaminering.

TRI 002 og Binab TF gav en signifikant reduktion af pulverskurv-koloniseringen i begge gentagelser, hvilket stærkt underbygger, at disse middel besidder et potentiale til bekæmpelse af pulverskurv. Forsøgsdesignet var sådant, at der blev anvendt en meget høj inokulum-mængde af pulverskurv, som må antages at være urealistisk høj i forhold til, hvad der forekommer naturligt i jord i kartoffelmarker og i forhold til den mængde, som forekommer på læggekartofler. Det kan derfor formodes, at der kan opnås en større reduktion ved lavere inokulum-mængder. Det er også muligt, at nogle af de andre midler vil give en signifikant virkning ved lavere inokulum-mængder, som f.eks. *Bacillus subtilis*, som i det ene forsøg reducerede koloniseringen af pulverskurv signifikant. Et forhold ved pulverskurvs biologi, som gør det meget vanskeligt at forudsige, om nogle af midlerne vil give en tilstrækkelig virkning, er, at så snart pulverskurven er etableret i rødderne på værtplanten, vil pulverskurven producere nye opformeringscykler af zoosporer, hvis frigørelse kan forårsage infektioner i nye rødder.

Pulverskurv er en parasit, så det er derfor ikke overraskende, at infektion med pulverskurv gav sig udslag i en signifikant væksthæmning af værtplanten. Nogle af de afprøvede midler havde imidler-

tid en væksthæmmende effekt på værtsplanten, selv om de ikke reducerede infektionsgraden af pulverkurv i rødderne. Det gælder f.eks. Mycostop, som i et af de to forsøg gav en signifikant øgning af friskvægt af rod og top og af rodlængden. Dette fænomen kendes for en del mikrobiologiske midler i andre plantearter.

Tilsætning af den mykorrhiza-dannede svamp *Glomus intraradices* hæmmede ikke infektionsgraden af pulverkurv. Derimod hæmmede *Glomus intraradices* både top- og rodvæksten. *Glomus intraradices* er en svamp, som koloniserer værtsplantens rødder. Normalt har begge parter fordel af symbiosen, idet svampen modtager assimilater fra planten, mens svampen øger plantens rodnet meget og leverer øgede mængder fosfor og kvælstof til planten. I nærværende forsøg har det imidlertid kostet planten mere, end den har modtaget fra svampen. Det kan skyldes, at forsøgene er udført i vintermånederne i væksthuse, hvor lys er i underskud, og planternes assimilation har været meget lav, således at det har været lys og ikke næringsstoffer, som har været den væksthæmmende faktor.

Projektets perspektiv er, at såfremt nogle af midlerne er effektive til at bekæmpe pulverkurv, kan det undersøges, om de kan anvendes til at bejdse læggekartofler med, med det formål at undgå at sprede pulverkurv, men først og fremmest kartoffelmop-topvirus med læggematerialet. Inden afprøvning af midlerne som bejdse igangsættes vil det være nødvendigt med en nærmere undersøgelse af de to midler. Der blev som tidligere nævnt anvendt urealistisk høje mængder af smitstof af pulverkurv. Det er nødvendigt at undersøge, hvordan de to midler opfører sig ved lavere inokulum-mængder, og endvidere, om det er muligt at fremme etableringen og væksten af den mikrobiologiske organisme, ved at give det en "madpakke" med i form af et næringssubstrat. Den næste fase vil være at afprøve midlet som knoldbejdse og undersøge virkningen på spredning af pulverkurv og af mop-top med virus-inficeret pulverkurv.

Publicering

Projektet er omtalt i Nielsen, S.L., Larsen, J., Nicolaisen, M., Hansen, K.R. & Trosborg, F. 2003. Mop-top i Danmark – status og perspektiver. 20. Danske Planteværnskonference. Korn, kartofler, skadedyr, miljø og postere. DJF rapport Markbrug 89, 125-136. Hovedresultaterne blev fremlagt mundtligt på konferencen.

Resultaterne blev fremlagt i et foredrag hos Estrella A/S for besøgende norske kartoffelavlere i Ålborg d. 19/3-03.

Resultaterne vil blive publiceret i et internationalt tidsskrift.

Flakkebjerg d. 14-4-03

Steen Lykke Nielsen
Projektleder