

## **BEKÄMPNINGSSTRATEGIER MOT KRANSMÖGEL I RAPS BASERADE PÅ TILLFÖRSEL AV ANTAGONISTISKA MIKROORGANISMER**

Sadhna Alström, doc och Björn Andersson Agr. D  
Institutionen för skoglig mykologi och patologi. Box 7026, 75007, Uppsala  
Extern expert: Eva Twengström, Agr.D.  
Projekt nr: 0433024

---

### **Bakgrund**

Efterfrågan på rapsfrö har ökat starkt med stigande priser som följd. Lönsamheten för oljväxtodling har därför förbättrats och den odlade arealen ökar. En ökning av oljväxtarealen är också önskvärd på grund av att ökat inslag av oljevaxter i stråsådesdominerade växtföljder leder till minskat sjukdomstryck i dessa och därmed till minskat bekämpningsbehov. Ökad odling av oljevaxter kan emellertid leda till ökade problem med vissa av oljeväxternas skadegörare. e.g. kransmögel, orsakad av svampen *Verticillium longisporum*. En stor del av den svenska oljväxtarealen utgörs av höstraps och i Skåne och i delar av Östergötland är problemen med kransmögel stora. Behandling med fungicider har ingen effekt mot kransmögel. Stor ekonomisk betydelse, avsaknad av effektiva kemiska bekämpningsmöjligheter och långlivade mikrosklerotier (>10 år) gör att det är angeläget att utveckla bekämpningsstrategier mot kransmögel. På kort sikt kan strategier baserade på biologisk bekämpning genom tillförsel av antagonistiska mikroorganismer vara den metod som ligger närmast praktisk användning.

Många antagonistiska svampar och bakterier har visat sig minska patogenangrepp och öka skörden. I våra tidigare SLF-finansierade studier undersöktes utvalda mikroorganismer med avseende på deras effekter mot *Verticillium*. Dessa studier visade på en signifikant ökning i fröskörden (upp till 47 %) efter tillförsel av mikroorganismer till kransmögelsmittad fältjord i växthusstudier. Långtidsverkan behövs för att få effekt av mikroorganismer som inte direkt dödar patogenen.

I det här slutrapporterade projektet var syftet:

- att vidareutveckla effektiva mikroorganismers skördepåverkande effekter i naturligt smittad jord och patogenhämmande egenskaper mot flera patogenstammar samt att utvärdera antagonistiska effekter mot myceltillväxt och bildning av mikrosklerotier
- att undersöka inverkan av olika doser av mikroorganismer samt antal appliceringar (både före och/eller efter sådd) i syfte att ta fram den optimala dosen, en behandlingsintervall för bästa effekt i grödan.
- att kombinera effektiva antagonister med olika önskvärda egenskaper för att uppnå en förstärkt bekämpningseffekt
- att studera mikroorganismernas inverkan på mängd smitta (mikrosklerotier) i jorden. De effektivaste behandlingarna utvärderades vid,
- fältmässiga förhållanden.

Projektet beviljades medel för två år.

## Material och metoder

Arbetet inleddes med renodling och uppförökning av potentiella antagonistiska organismer och skadesvampen, *V. longisporum*. Testantagonisterna härstammade från flera olika växtarter. Laborrietester utfördes på potatisdextrosagar (PDA) i syfte att identifiera de effektivaste antagonisterna mot *V. longisporum*. PDA valdes som testmedium för det gynnar både myceltillväxt och mikrosklerotiebildning. Graden av hämning bedömdes på en skala av 0-3 där 3 stod för den starkaste hämningen av svampens samtliga strukturer. Även utsöndring av antagonistiska ämnen t.ex. sideroforer, cyanid och hydrolytiska enzymer analyserades. Som ett resultat av dessa förberedande studier valdes ca 50 stammar ut för studier under fältmässiga förhållanden.

### Försök med vårraps utomhus

I första omgången testades 21 olika mikroorganismer (Tabell 1) på vårraps (*SW H2812*) i ett kärlförsök utomhus. Jord naturligt infekterad med *Verticillium* blandades med små lerkulor (1:1), grundgödslades och fylldes i odlingslådor (35cm x 25cm x 20cm). Lådorna behandlades med mikroorganismer i vätskeform en vecka före sådd med vårraps (50 frö per låda). Kontrolletet behandlades med vätska utan mikroorganismer på motsvarande sätt. Fyra lådor användes per behandling. Lådornas placerades slumpvis och kankärl placerades runt hela försöket för att minska kanteffekterna. Två veckor efter sådd registrerades uppkomst och plantorna gallrades ner till 6 plantor per låda för att växa till skörd. (Fig 1). Två appliceringar per mikroorganism utfördes under växtsäsongen.

Antal fallna gula blad på grund av angrepp av *Verticillium* (en gång i veckan) och antal stjälkar med smitta av *Verticillium* registrerades under hela försöksperioden. Försöken skördades, och fröskörden analyserades avseende tusenkornvikt, oljehalt, proteinhalt med mera. Angrepp av rapsjordloppor och bladlöss förekom under säsongen och bekämpades manuellt. Även rapsbaggeangrepp förekom men bedömdes så svaga att ingen bekämpning utfördes.

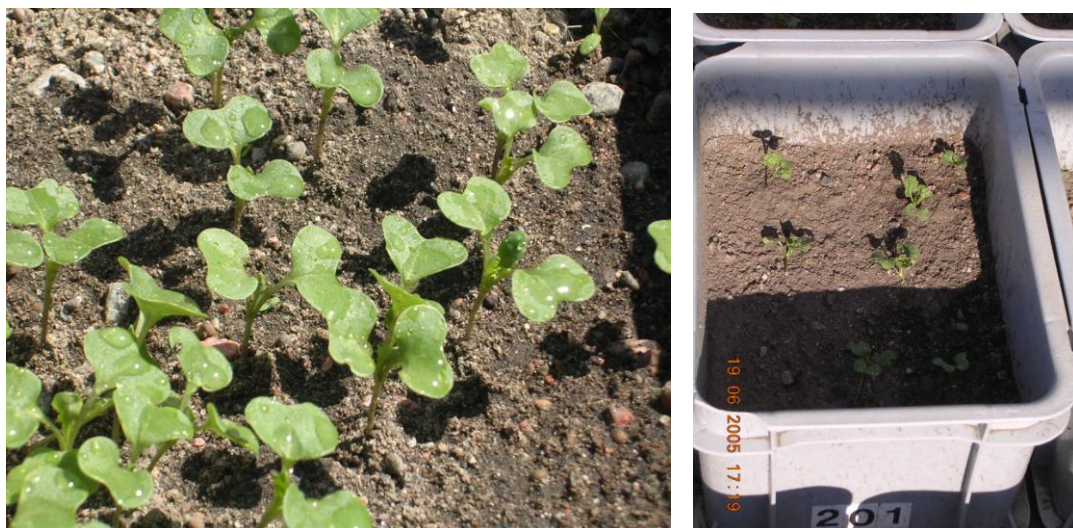


Fig. 1. Odlingskärl med unga vårraps plantor (50 st sådda per låda). Sex plantor lämnades för tillväxt fram till skörd (till höger).

### Försök med höstraps i växthus

I vår grundansökan var syftet bl a att utvärdera mikroorganismers effekter i fält på naturligt smittad jord. Datasamling och sammanställning av resultat från utomhusförsök i vårraps ovan blev inte klara i tid för hinna lägga ut fältförsök i höstraps under 2005. I samråd med SLF beslutade vi att lägga ut ett fältförsök på höstraps under andra året, det vill säga hösten 2006. Under hösten 2005 utfördes istället ett växthusförsök i höstraps under så långt som möjligt fältliknande förhållanden. Avsikten med försöket var att bestämma effekter av de mikroorganismer som ej testats tidigare för att kunna välja de mest lovande för kommande höstrapsförsök. Även i detta försök användes naturligt smittad fältjord.

Krukförsöket utfördes i växthus med höstraps (cv Banjo). Jämnstora plantor planterades i krukor (13cm x 13cm x 13cm, en planta/kruka) med naturligt kransmögelsmittad jord insamlad från ett rapsfält i Östergötland. 80-90 % av plantorna fick kransmögel i rapsgrödor odlade på fältet. Jorden (pH 6,4; (mg/100g P\_Al: 4,7, Kl III; K\_Al 6,6; Kl II; Mg\_Al 7,8; K/Mg 0,85; Ca\_Al 333; K\_HCl 51; Kl 2); Cu\_HCl 8,7 mg/kg; P\_HCl 40,8 mg/100g; jordart mmh i Mo; mullhalt 6 %, lerhalt 13 %) grundgödslades före försökets start. Mikroorganismerna uppodlades på lämpligt substrat i 2-7 dagar och tillfördes som vätskesuspension (25ml/ kruka) vid omplantering. En dos och en behandling av samtliga isolat testades på detta sätt (n=8). Rhizostar, ett tyskt kommersiellt tillgängligt bakteriepreparat ingick också i undersökningen.



Fig. 2. Krukförsök med höstraps (Banjo) i växthus

Vernalisering av plantorna utfördes vid 4-blad stadiet genom att gradvis sänka temperatur till 5-6 C och minska ljusperioden till 5-6 timmar/dag under ca 8 veckor. (Fig 3).

Kantplantor ordnades i syfte att minimera kanteffekter och alla försökskrukor vattnades, gödslades och roterades regelbundet. Effekt på fröskörd, tusenkornvikt, oljehalt och halmvikt av tillförelse av mikroorganismer bestämdes.

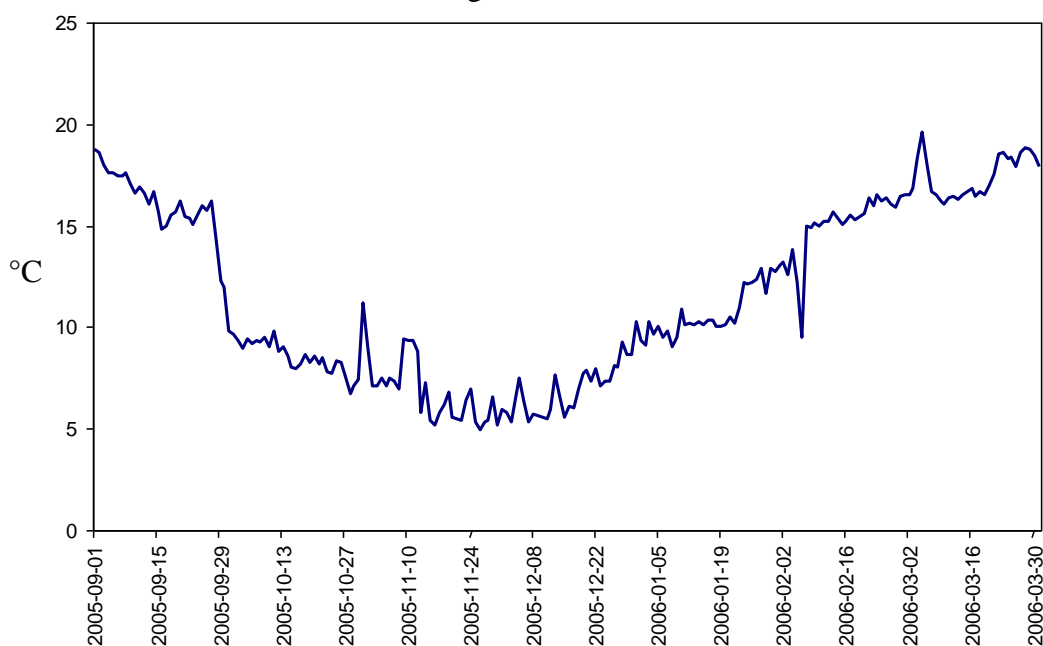


Fig. 3. Vernalisering av växthus odlade höstrapsplantor (Banjo).

#### Försök med höstraps i fält

Som ett resultat av våra erfarenheter från undersökningarna ovan valdes nio organismer ut för ett fältförsök i höstraps. Försöket lades ut i början på augusti 2006 på ett fält i Borensberg, Östergötland. Fältet anses av jordbrukaren vara starkt smittat av kransmögel. Försöket utfördes som ett fullständigt randomiserat parcellförsök med tre block och 10 behandlingar (9 organismer och en kontroll). Parcellstorleken var 1,9 m x 12 m. Försöket grundgödlades enligt rekommendation. I försöket tillfördes bioantagonisterna både som fröbetning och jordinokulum. För betning odlades mikroberna och tillfördes med bl.a. karboxymetylcellulosa och talk. Jordinokulum bereddes som en blandning av mikrober i steril sand, gammastrålad jord, aktivt kol och en svag näringslösning. Inokulum lagrades kallt före användningen, och tillfördes efter uppkomsten.

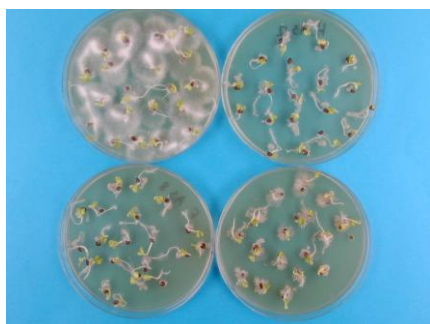


Fig. 4: Frö (cv Banjo) betade med olika mikrober i syfte att kontrollera mikroorganismernas överlevnad på fröet och eventuell negativ inverkan på uppkomsten.

Mikrobernas överlevnad på betade frö (SW Banjo, ej insekticid- eller fungicidbetat) kontrollerades före sådden genom att inkubera fröna på lämplig agar och avläsa antal grodda frön av betade resp. obetade. (Fig. 4). I kontroll rutorna tillfördes inga mikrober. Ingen negativ inverkan på grobarheten kunde observeras.

## Resultat

### Försök med vårraps utomhus

Uppkomsten varierade mellan 61 och 86 % beroende på behandling. Uppkomsten i kontrollådrorna var 66 %. Av de 21 stammarna medförde 17 st en förbättrad uppkomst, se tabell 1. Förutom att flera av organismerna förbättrade uppkomsten noterades en positiv effekt även i flera andra avseenden.

Tabell 1: Effekt av potentiella antagonister mot *V. longisporum* på vårraps (SW H2812) sådd i naturligt kransmögelsmittad fältjord med avseende uppkomsten, förekomst av gula blad, fröskörd, tusenkornvikt, vattenhalt och oljehalt. (fyra kärl per behandling med 50 frö per odlingskärl i försök utförd utomhus). In vitro hämning studerades för tre olika stammar av *Verticillium longisporum*.

Behandling	% uppkomna	% ökning uppkomna	Kitinasbildande	Cellulasbildare	Biocontrol potential*	Fröskörd (g)	% sködreökning	Tusenkorng (g)	Tot N % av TS	Antal gula blad	Vattenhalt, %	Oljehalt, %	Yield supporting potential**
180 D	76,5				8	14,82		3,56	3,7	11,25	6,4	43,42	50
ARLS 515	79,5	20			8	14,75		3,65	3,96	8,25	6,79	42,64	53
LF 5	74,5	13			8	14,61		3,25	3,94	8,5	6,29	41,79	27
<b>DMB 12</b>	<b>66</b>		+	+	<b>6</b>	<b>16,6</b>	<b>12</b>	<b>3,44</b>	<b>3,94</b>	<b>9</b>	<b>6,55</b>	<b>45,5</b>	<b>52</b>
BS 2	77,5		+	+	7	14,1		3,33	4,13	7,75	6,62	40,12	25
S 97t	62				5	10,88		3,12	3,98	10,5	6,63	40,21	7
<b>AS 8</b>	<b>70</b>	<b>6</b>	+	+	<b>8</b>	<b>17,59</b>	<b>19</b>	<b>3,51</b>	<b>4,1</b>	<b>7,75</b>	<b>6,54</b>	<b>41,72</b>	<b>50</b>
67A*	67				2	15,3		3,4	3,84	8,5	6,48	41,28	32
S 414	82	24			9	15,24		3,58	3,9	9,75	6,66	41,07	49
<b>S 99</b>	<b>85</b>	<b>29</b>			<b>8</b>	<b>16,54</b>		<b>3,83</b>	<b>3,91</b>	<b>10,25</b>	<b>6,62</b>	<b>42,6</b>	<b>69</b>
<b>AS 9</b>	<b>78,5</b>	<b>19</b>	+	+	<b>9</b>	<b>16,4</b>	<b>11</b>	<b>3,69</b>	<b>3,78</b>	<b>9</b>	<b>6,25</b>	<b>45,15</b>	<b>69</b>
<b>AS 12</b>	<b>83,5</b>	<b>26,5</b>	+	+	<b>9</b>	<b>17,54</b>	<b>18,7</b>	<b>3,79</b>	<b>3,97</b>	<b>9</b>	<b>6,52</b>	<b>43,93</b>	<b>76</b>
S 409	78	18			10	14,83		3,68	4,06	9	6,75	41,57	48
DMB 18	80	21	+	+	9	15,09		3,25	4,34	8,75	6,45	39,97	33
S 43	76,5	16			8	12,48		3,37	4,02	11	6,55	41,21	25
<b>S 64</b>	<b>76</b>	<b>15</b>	-	+	<b>11</b>	<b>16,83</b>	<b>13,9</b>	<b>3,5</b>	<b>3,86</b>	<b>7,75</b>	<b>6,55</b>	<b>44,86</b>	<b>58</b>
AS 2	86	30			7	13,79		3,21	3,94	8,5	6,49	42,84	42
AS 1	78,5	19			9	15,45		3,51	3,93	8,75	6,55	42,25	51
<b>S 4</b>	<b>83,5</b>	<b>26,5</b>	-	+	<b>8</b>	<b>18,12</b>	<b>22,6</b>	<b>3,26</b>	<b>3,84</b>	<b>10,5</b>	<b>6,36</b>	<b>44,04</b>	<b>66</b>
S 25	86,5	30,5			10	14,04		3,5	3,95	11	6,53	42,81	52
<b>S 143</b>	<b>61,5</b>		+	+	<b>4</b>	<b>16,93</b>	<b>14,5</b>	<b>3,95</b>	<b>3,85</b>	<b>8,75</b>	<b>6,57</b>	<b>42,61</b>	<b>55</b>
<b>Kontroll</b>	<b>66</b>					<b>14,78</b>		<b>3,24</b>	<b>4,04</b>	<b>9,5</b>	<b>6,72</b>	<b>41,44</b>	<b>22</b>

AS 9 och S 64 är cyanidproducenter

S 64 and DMB 12 producerar bioaktiva kelatämnen

Alla utom bakterien 67A är mellan starka till starka verticillium hämmare

\* visar poäng för samlad bedömning av biokontroll effektivitet.

\*\* visar poäng samlad bedömning av samtliga skördepåverkande egenskaper

Ingen märkbar effekt på antal gula blad (ett grovt mått på infektion av kransmögel) kunde mätas i försöket. De enskilda mikroorganismerna skördepåverkande förmåga (YSP) bestämdes. Minst fem mikroorganismer, främst bakterier, AS 12, AS 9, S 99, S4 och S64 visade högst YSP (mellan 76 – 58), se tabell 1. Intressant nog hade två av dessa mikroorganismer isolerats från raps.

#### Försök med höstraps i växthus

Resultaten från växthusförsök i höstraps med avseende på fröskörd, tusenkornvikt och halmvikt är sammanställda i figur 5-7. Jämfört med kontrolledet visade enstaka behandlingar en ökning av halmvikten med 25 %, fröskörden med 24 % och tusenkornvikt med 19 %. Fem mikroorganismer inklusive Rhizostar hade en tendens till skördesänkande effekt. Skördeskillnaderna var dock inte statistiskt signifikanta. Inte heller i detta försök kunde någon effekt på antal gula blad per plantan mätas. På grund av att försöket utfördes i växthus, var fröproverna per behandling mycket små. Oljehalten kunde därför bara analyseras ledvis för ett begränsat antal behandlingar. Resultaten visade en ökning av fetthalten med isolat AS 13 (4,3 % jämfört med kontrollen 39,3 % av TS). AS 13 är isolerad från rapsplantor.

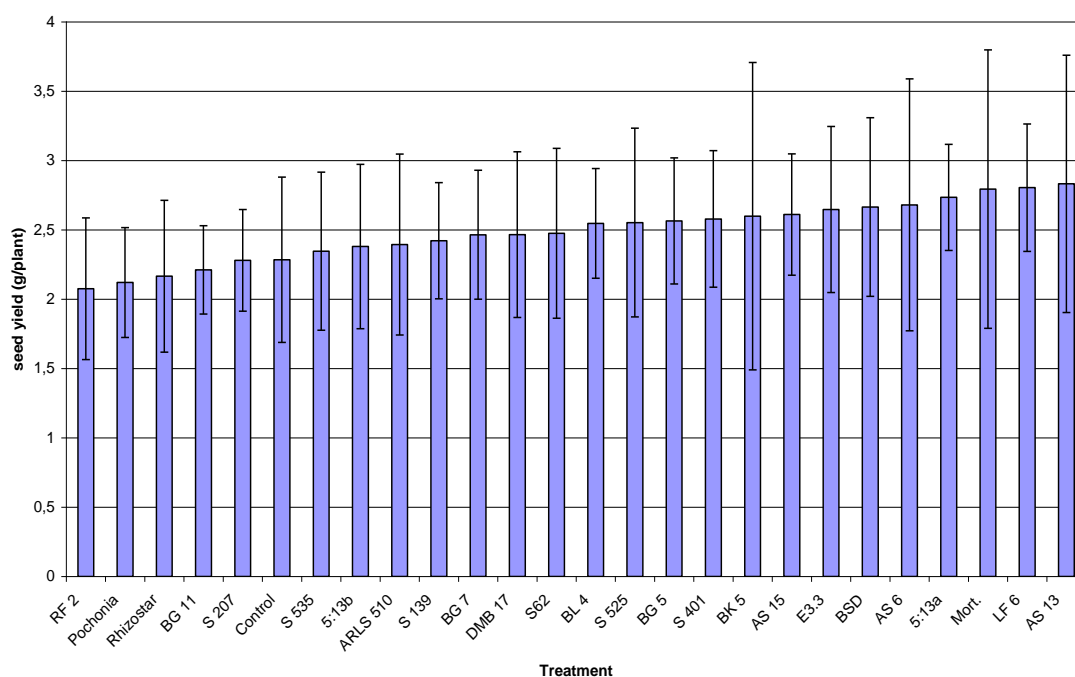


Fig. 5: Effekt av potentiella antagonister mot *V. longisporum* på höstraps (Banjo) sådd i naturligt kransmögel smittad fältjord med avseende på fröskörden. Felstaplarna anger 95 % konfidensintervall.

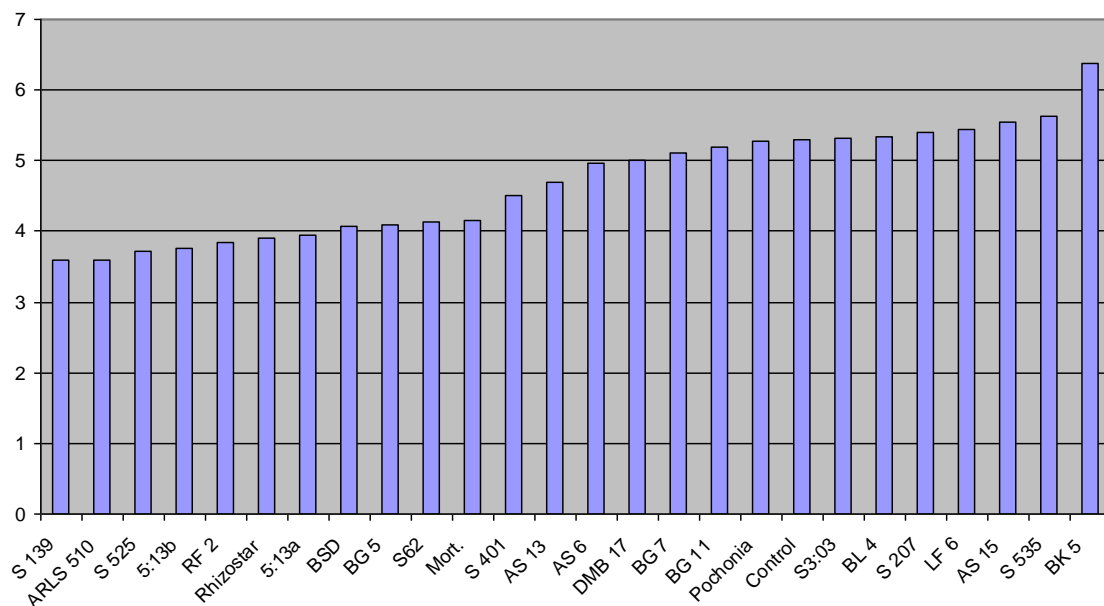


Fig 6: Effekt av potentiella antagonister mot *V. longisporum* på höstraps (Banjo) sådd i naturligt kransmögél smittad fältjord med avseende på tusenkornvikt

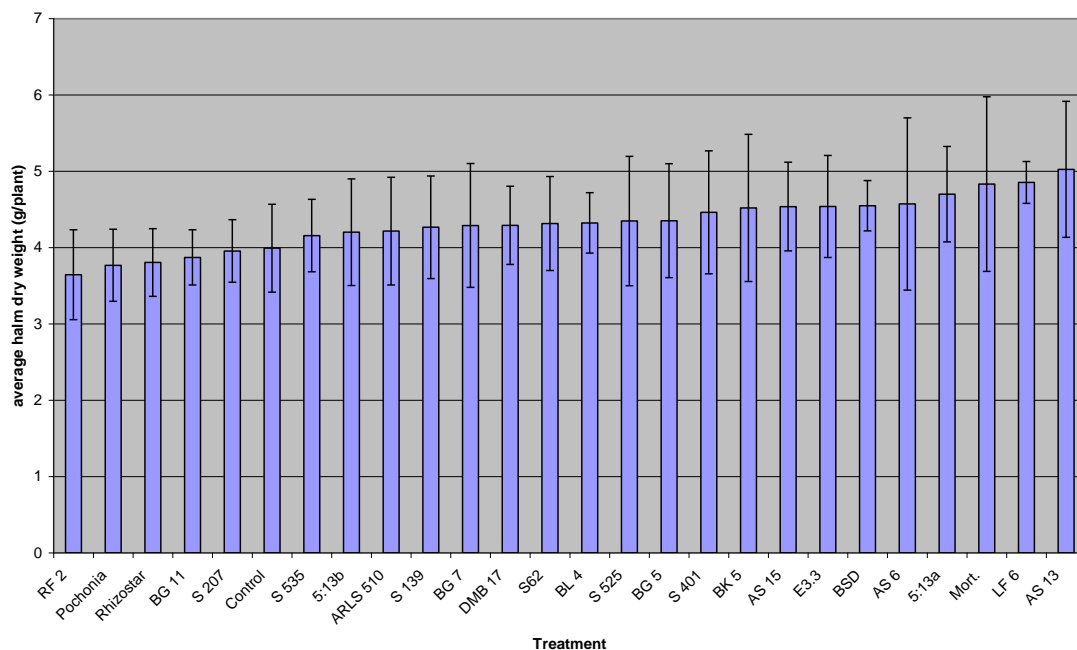


Fig. 7: Effekt av potentiella antagonister mot *V. longisporum* på höstraps (Banjo) sådd i naturligt kransmögél smittad fältjord med avseende på halmvikt. Felstaplarna anger 95 % konfidensintervall.

### Försök med höstraps i fält

Vid avläsningen av försöket ca en månad efter sådden noterades tidiga effekter av tillförsel av vissa bioantagonister efter fröbetning. Antal uppkomna förbättrades avsevärt för flera behandlingar, mest upptill 26 % (av AS 12, Fig 8 och 9).



Fig. 8: Skillnaden i uppkomsten av höstrapsen (Banjo) i två olika behandlingar i Borensberg i Östergötland. Kontroll till höger.

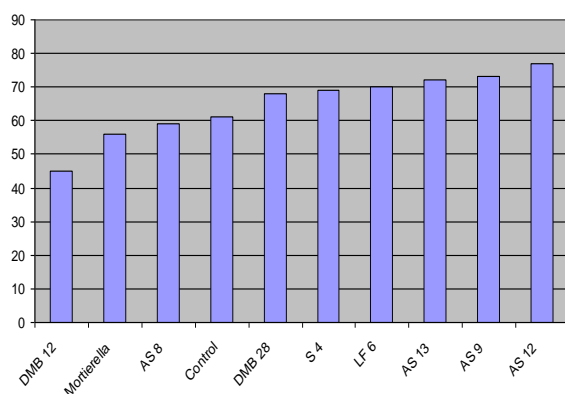


Fig 9. Skillnaden i uppkomsten av höstrapsen (sort Banjo) i ett naturligt smittat fält i Borensberg en månad efter sådden av fröna betade med 9 olika mikro-organismer. Blockförsök med tre block



Fig.10 . Jordinokulum av en bioantagonist som tillfördes försöksrutorna en månad efter sådden. Höstrapsförsöket påbörjat i Borensberg aug. 2006.

## Diskussion

Både i tidigare undersökningar och ovan redovisade undersökningar konstaterade vi förekomst av groddbränna i försökjor. En tydlig effekt av antagonistiska mikro-organismer konstaterades på uppkomsten både i vårraps (+30%) och höstrapsförsöken (+26%). Avsikten med höstrapsförsöket i Borensberg var också att undersöka antal groddbrända plantor i olika parceller men plantorna hade vid avläsningstidpunkten ett för långt gånget utvecklingsstadium för att det skulle vara möjligt att urskilja groddbrännesymptom. Metoden för avläsning av denna typ av symptom behöver förbättras.

I samtliga försök avlästes gula blad som ett grovt mått på kransmögelangrepp. Vi bedömde däremot inte graden av gulfärgning. I våra tidigare undersökningar minskade



vissa antagonister symtomen av kransmögel då andel angripen bladyta bedömdes omsorgsfullt (Alström opublicerat). Skillnaden i antal gula blad var inte statistisk signifikant i resultaten redovisade ovan. Grundsmittnivån i försöksjorden var mycket hög och endast en dos och ett begränsat antal behandlingar ingick i försöket. Vi bedömer därför att behandlingarnas effekt på angrepp under flera säsonger på samma fält bör utvärderas. Dessutom behöver försök med flera appliceringar av en och samma mikroorganism enskilt eller i lämpliga kombinationer genomföras.

Vi har visat att vissa mikroorganismer hämmar kransmögelsvampen effektivt i laboriemiljö. Skillnaderna i skörderesultat var i flera fall korrelerade till mikroorganismernas antagonistiska förmåga mot skadesvampen i laboriemiljö. Detta var dock inte fallet för deras effekt på antal gula blad. Resultaten erhållna inom ramen för detta projekt är i linje med våra tidigare observationer avseende naturligt förekommande bakterier, särskilt de i rapsens egen ”skaffer” av mikroorganismer. Dessa organismer har potential att höja YSP i raps. De gynnsamma effekterna av bakterierna beror sannolikt på att den mikrobiella sammansättningen ändras och att aktiviteten ökar i rotzonen på växande plantor. En ytterligare förklaring kan vara att toleransen hos rapsplantan förstärks i stark smittad jord. Att skillnader mellan behandlingar inte var stora i höstraps i växthusförsöket kan bero på problemen med att hålla odlingsförhållanden på rätt nivå under odlingen efter vernaliseringen.

Jordprover togs från varje låda för att försöka göra en kvantitativ och kvalitativ bedömning av jordsmittan. Inverkan av mikroorganismernas på mängd smitta i jorden och huruvida den minskar med tiden har dock inte kunnat undersökas pga metodsvårigheter. Metoder som bygger på en jordtest genom framsällning av mikroskopier och som kan visa på nivån på smittoämnen i jorden är under utveckling.

Våra studier visar att det finns en stark outnyttjad potential hos naturlig förekommande mikroorganismer, särskilt de som associerade med raps. Dessa mikroorganismer kan användas för att förbättra uppkomsten och höja skörden i kransmögelsmittade fält. Denna kunskap i kombination med att dessa organismer sannolikt har effekt även mot andra jordburna sjukdomar i jorden (e.g. groddbränna) gör att vissa bakterier med intressanta egenskaper kan komma till ökad användning i framtida rapsodling i Sverige. För kransmögel och groddbränna där alternativet är användande av jordfungicider och toleranta sorter (som ännu ej existerar) erbjuder utveckling av kunskap kring nyttiga bakterier en möjlighet till en ökad odlings säkerhet i svensk oljeväxtodling.

### **Resultatförmedling bl.a. till näringen.**

Alström S, Twengström, E. och Andersson B. Different strategies to control *Verticillium* wilt in oilseed rape. Sammanfattning. Arbetet avses presenteras på Oljeväxtdag i Alnarp LF, mars 2008.

Alström, S, Twengström, E. och Andersson B. Att reducera skörde förluster i oljeväxter pga svampangrepp (fokus på Kransmögel, *Verticillium longisporum*). Föredrag inför 1) oljeväxtgruppen ledd av Albin Gunnarson vid Ultuna. 11 sept. 2006 och inför 2) forskare vid Växtpatologi möte, Inst. för skoglig mykologi och patologi. hösten 2006.

Alström S., Bharadwaj D. P. and Twengström E. Interactions of soil inhabiting micro-organisms with Verticillium wilt pathogen in oilseed rape Focus on Soils Symposium 'Managing Soils for the Future', 14-16 Sept.2005. Uppsala.

Återkommande diskussioner med Albin Gunnarsson, Oljeväxtgruppen

**Manuscript – to prepare**

Kader A, Twengström E and Alström S. - Effect of antagonistic micro-organisms on Verticillium longisporum and oilseed rape.

Alström, S., Twengström, E. and Andersson B.. Efficacy of antagonistic micro-organisms in controlling Verticillium longisporum in oilseed rape in field conditions