

Slutrapport SLF projekt, H1333238

Bestämning av rotdjup i spannmålsgrödor med kvantitativ PCR teknik.

Huvudsökande

Ulf Axelson

Hushållningssällskapet Skaraborg/
SLU Skara

Medsökande

Anders Jonsson

SLU, Skara

Sammanfattning

Bakgrund

Utvecklingen inom lantbruket har inneburit allt större och tyngre maskiner med packning och markstrukturproblem som följd, vilket anses innebära en risk för den långsiktiga bördigheten hos våra jordar. En för grödan optimal rotutveckling är förutsättningen för en väl utvecklad gröda och hög skörd. Rotens utveckling är kanske den bästa mätaren på hur tillståndet är för våra jordar. Inget mätinstrument kan efterlikna det faktiska arbetet som en rot utför. Därför är rotstudier oerhört viktiga för att avgöra statusen på odlingsjordarna, både vad gäller packning men även andra faktorer som näringstillgång, föroreningar, rotspärrar m.m. (Lux and Rost, 2012)

Vid studier av rotutveckling har det hittills används metoder som inneburit en tidskrävande och omsorgsfull uttagning av ostörda jordprofiler, noggrann rengöring/tvättning av rötter och ofta följt av bildanalys av rotlängd (www.skyeinstruments.com) Möjligheten att studera rötter under fältmässiga förhållanden är begränsade främst på grund av det kräver stora resurser. Den vanligaste metoden är att gräva ur profiler och tvätta fram rötterna manuellt (Metcalf et al. 2007). Tekniken har flera nackdelar, förutom att det är arbetsamt är det lätt att finrötter tvättas bort och det är också svårt att skilja på rötter från olika arter av växter. (Watt et al. 2008) (Oliveira et al. 2000).

Löfkvist et.al (2005) beskriver en snabbmetod för att undersöka skillnader i rot penetration mellan arter och även mellan sorter. Clark et al. (2000) har vid odling i rör visat på skillnader på upp till 20 ggr för möjlighet hos rötter från olika rissorter att tränga igenom konstgjorda rotspärrar i form av hårda vaxlager.

DNA teknik har under ca 15 års tid använts för att identifiera tillhörighet hos rötter i artrika växtbestånd (Mommer et al., 2011). Under senare år har SARDI i Australien utvecklat metoder för bestämning av rot biomassa i lantbruksgrödor med hjälp av jordprov och DNA extraktion (McKay et al., 2008; Riley et al., 2010). Metoderna bygger på bestämning av artspecifik rot-DNA med hjälp av qPCR teknik. Med denna teknik kan rotutveckling, rotlängd och biomassa bestämmas i ostörda fältprov och rötter från olika arter sorter kan särskiljas (Haling et al., 2011). Det borde alltså kunna gå att på ett relativt enkelt och reproducerbart sätt gå att skatta rotutveckling och rotdjup. Detta skulle ge en förbättrad bild av hur rötter har utvecklats och hur rotutvecklingen påverkats av olika belastningar samt hur olika gröders rötter utvecklas i konkurrens med varandra.

McKay et al. (2008) beskriver möjligheten att med kvantitativ PCR-teknik studera nedbrytning av rajgräsrötter, vertikal tillväxt av veterötter, horisontell rotfördelning hos olika torkresistenta kornsorter samt möjlighet att skilja olika arter i permanenta betesmarker.

Mc Kay et al. (2008) sammanfattar undersökningens slutsatser med fördelarna med kvantitativ DNA teknik jämfört mot traditionell tvättning av rötter med följande:

- ingen förlust av finrötter som däremot uppstår vid tvättning
- provtagning är enkel och möjlig i ostörd jord
- arter kan urskiljas i blandade bestånd
- mycket små mängder rot-DNA kan detekteras i ett prov

Haling et al. (2011) visar att det är möjligt att identifiera och särskilja olika arters rotutveckling i blandbestånd med hjälp av kvantitativ PCR-teknik. I försöket jämfördes rotutvecklingen mellan arter vid kalkad och okalkad jord. Mommer et al. (2008) bestämde med PCR-teknik proportionerna av individuella plantor av arter i blandade bestånd i tvättad sandjord och redogör för möjligheten att med kvantitativ PCR-teknik bestämma och skilja på olika arters genotyp.

Med tekniken kunde Riley et al. (2010) detektera ned till 2 mg rot eller frö per kg jord. Det har noterats att mängden rot DNA minskade med ålder på rötterna vilket antyder att finrötter innehåller mer DNA per massa (Riley et al. 2010). Studien visar också att det sker en snabb nedbrytning av DNA i rötter hos plantor som avdödats med Glyfosat eller skördats. Studien bekräftar att det enbart är levande rötter som skattas i PCR-analyserna. I en studie av McKay et al. (2008) visades redan efter 10 dagar en nedgång med 80% i halten rot DNA från rajgräs i jord där rajgräset avdödats med Glyfosat. Chun et al. (2013) uppger att 90 % av rot DNA bryts ned inom 7-10 dagar efter plantans avdödning.

I en delstudie gjordes en jämförelse med uttagning av rötter i grävd profil och provtagning med borrhör för senare analys av rot-DNA. Detta medför att vi kunde jämföra bestämning av rotmassan på två sätt. I projektet har detta gjorts i grödorna vårkorn, höstkorn, engelskt rajgräs och vårvete

I den andra delstudien följdes förändringen i rot-DNA efter klippning avdödning. I projektet undersöktes vårkorn.

Målsättningen är att endast mäta rotutvecklingen på den växande grödan och inte tidigare års grödor eller andra växters rötter.

Syftet var att undersöka om metoder baserade på PCR-teknik kan användas för bedöma rotutveckling i jordar. Det kan med metoden bli möjligt att selektera sorter med olika anpassningar till varierad packning och struktur på olika jordar. Det kan också bli möjligt att selektera på rotdjup för att t.ex. ta fram torktåliga sorter. Metoden kan även användas i andra försök, t.ex. växtnäringförsök, och ge en ökad förklaringsgrad till resultat. Allt detta skulle kunna göras med ett enkelt jordprov!

Material och metoder

Kvantifiering av rotmassa i fältförsök

Proverna togs från parceller ett fältförsök på Ågården Västergötland. (58°29'10.11"N, 13°7'40.65"O). För att underlätta hantering och rengöring av rötter låg försöket på en måttligt mullhaltig lerig sand (mmh lSa).

pH	P-AL	P-HCl	K-AL	K-HCl	Mg-AL	Ca-AL	Cu-HCl	Mullhalt	Lerhalt	Sand grovmo
6,4	8,3	40	6,6	43	1,3	95	3,9	3,7	6	79

Tabell 1. Markanalyser från matjorden i försöksfältet



a.

b.

Bild 1 a och b.

a. Markprofilen på försöksfältet ned till 60 cm djup.

b. Bild på cylindrarna som användes för provuttagning

I försöket såddes höstkorn, vårvete, vårkorn och engelskt rajgräs. Vårgrödorna såddes med för respektive gröda normal utsädesmängd den 16 april. Höstkornet såddes i september 2013. Spannmålsgrödorna gödslades den 16 april med 360 kg NPK 25-3-6 och rajgräset med 150 kg NPK 25-3-6.

För varje led slumpades 4 st upprepade provtagningsplatser. Ett jordprov för manuell preparering och vägning av rötter togs ut med en cylinder med måtten 135x250 mm. Cylindern placerade över en rad och slogs ned med slägga till 200 mm djup. I direkt anslutning till varje cylinder togs 8 st jordprov ut med jordborr för ett samlingsprov för bestämning av rot-DNA (bild 2). Prover togs ut i tre nivåer, 0-20 cm djup, 20-40 cm djup och 40-60 cm djup.

Vid provtagning av en ny nivå grävdes en plan yta fram till rätt djup och provcylinder placerade direkt under föregående cylinder. Proverna togs vid full axgång i spannmålen (Zadok DC 59) och full axgång i rajgräset.

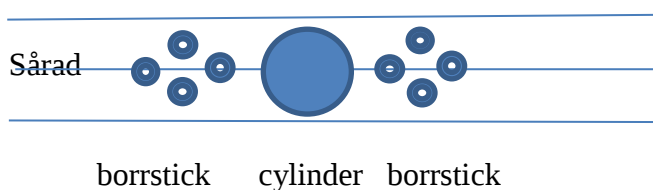


Bild 2. Skiss över provtagning av cylinder och borrstick

Jordproverna för PCR-analys torkades i värmeskåp i 35 grader C i 24 timmar. Proverna för bestämning av rot-DNA skickades med Posten AB till Dr McKay's laboratorium vid SARDI (<http://www.sardi.sa.gov.au/>) i Adelaide, Australien. De har en unik möjlighet att provbereda och extrahera DNA ur provmängder upp till 500g jord. Detektionsgränsen anges till 2 mg rot DNA per kg jord (Riley et al. 2010). Utvärderingen gjordes sedan i samverkan med McKays grupp och avdelning för precisionsodling och pediometri, Institutionen för mark och miljö SLU, Skara. Proverna för tvätt och vägning frystes ned. Tvättning, rengöring och vägning av rötterna gjordes sedan i HS laboriet på Logården, Grästorps,

Proverna för manuell bestämning av rotmassa tinades och torkades i rumstemperatur. Manuell bestämning gjordes i höstkorn och vårkorn. Eftersom arbetet var så tidskrävande fick vi begränsa oss till dessa två grödor. Proverna siktades med hjälp av en sil med maskstorlek 1-1,5 mm och rötterna plockades ur jordprovet med pincett. Varje jordprov vägdes i torkat tillstånd. Mängden rötter vägdes och relaterades till mängden jord i respektive provcylinder.

Kvantifiering av rotmassa efter klippning

PVC rör med invändig diameter på 11cm och längd av 60 cm fylldes med matjord. Jorden var inköpt trädgårdsjord. I botten på röret fästes en vattengenomsläpplig duk. Jorden vattenmättades och fem stycken kornkärnor såddes i varje rör. Rören placerades i en ställning med syfte att skugga varandra så lite som möjligt (Bild 3 a och b). Ogräs rensades bort för hand.

Plantorna i samtliga rör klipptes av vid axgång (Zadok DC 59). En viss återväxt skedde och plantorna klipptes av kontinuerligt under inkubationsperioden.

Vid 0,1,5 och 13 dagar efter avklippning preparerades rören för uttagning av jordprover. För varje tillfälle togs tre replikat. Rören sågades av i intervallen 0-20 cm, 20-40 cm och 40-60 cm.

Proverna för PCR analys torkades direkt i torkskåp i 35° C i 24 timmar. PCR proverna skickades efter torkning till Dr McKay's laboratorium vid SARDI (<http://www.sardi.sa.gov.au/>) i Adelaide, Australien för bestämning av förekomst av rot-DNA.



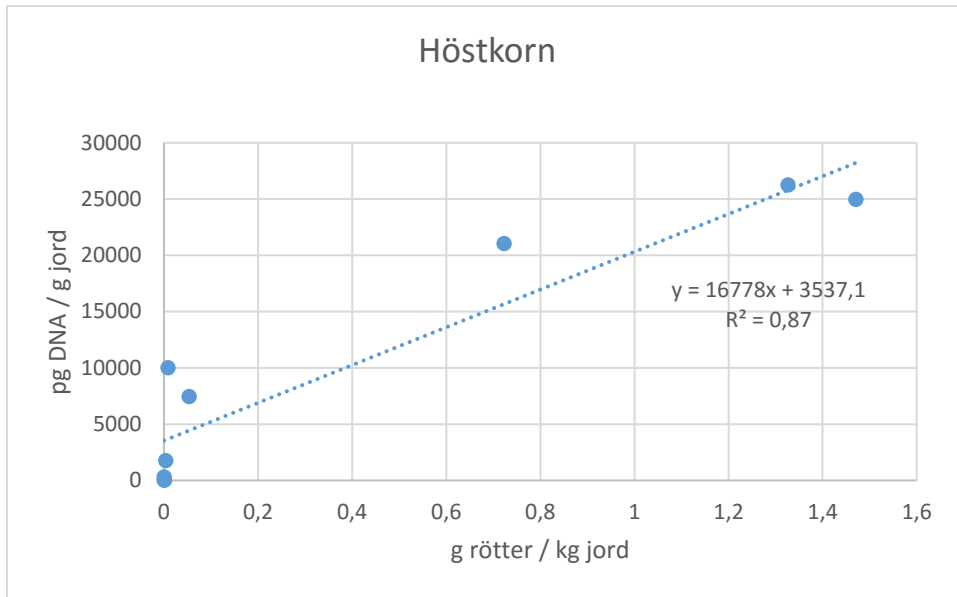
Bild 3 a och b. Bilder på odlingsrören och ställning till rören

Resultat

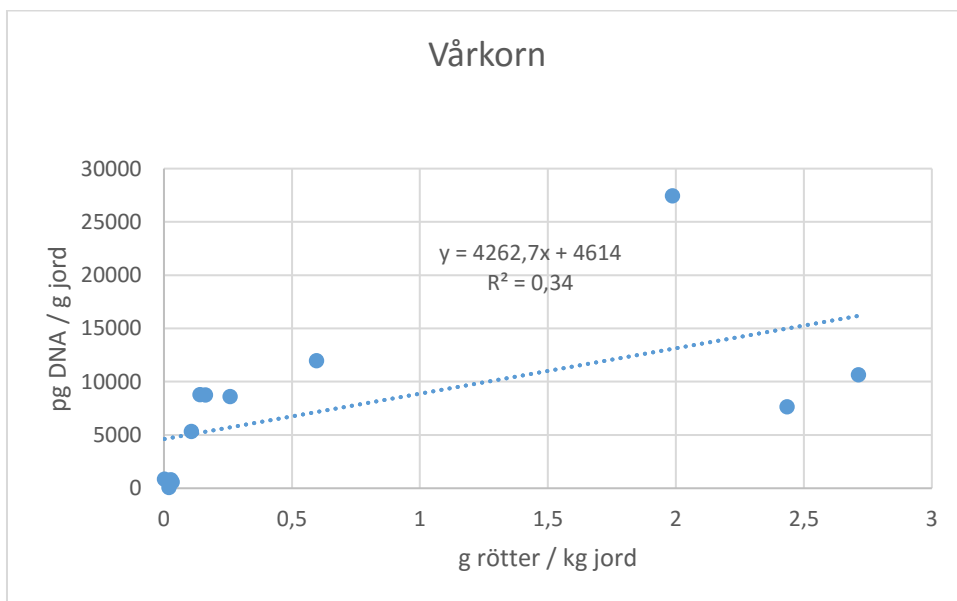
Halterna av rot-DNA avtog med stigande djup för alla grödor i fältstudien (tabell 2.).

Halterna på 40-60 cm djup var bara några få procent av vad som återfanns i de övre skikten.

Sambandet mellan manuell framtagning av rötter och rot DNA var för höstkorn $r^2 = 0,87$, för vårkorn $r^2 = 0,34$ (figur 1 och 2).



Figur 1. Sambandet mellan rot-DNA (pg/g jord) och mängden (g/kg jord) sållade rötter i höstkorn.



Figur 2. Sambandet mellan rot DNA (pg/g jord) och mängden (g/kg jord) sållade rötter i vårkorn.

Tabell 2. Mängd rot DNA (pg per g jord) för respektive gröda och nivå i fältförsöket

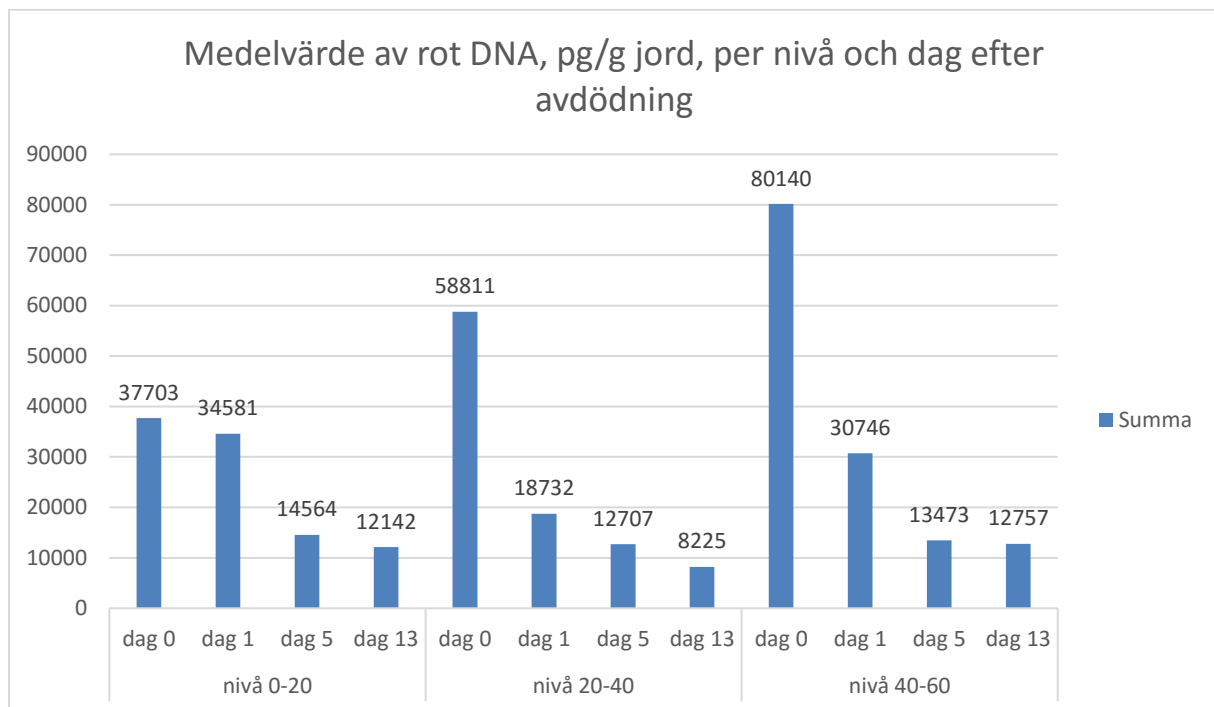
E. Rajgräs	Nivå, cm	pg DNA per g jord				Medel	Std error
	0-20	42992	60182	78889	53656	58930	13055
	20-40	13518	17267	23492	16782	17765	3607
	40-60	303	1509	1735	1723	1318	593
Höstkorn							
	0-20	26862	21055	26269	24986	24793	2262
	20-40	2860	10011	1791	7479	5535	3354
	40-60	13	29	32	332	102	133
Vårvete							
	0-20	21730	19735	5555	17416	16109	6282
	20-40	8437	4297	1445	1676	3964	2815
	40-60	262	995	2937	257	1113	1095
Vårkorn							
	0-20	7650	10636	27440	11972	14425	7676
	20-40	8594	8794	8747	5334	7867	1464
	40-60	806	862	593	60	580	317

Kvantifiering av rotmassa efter klippning

Halten av rot DNA var hög i hela rötet vid klippningen och högst i de djupaste delarna, 40-60 cm (tabell 3 och figur 3). Halterna avtog sedan under de kommande 13 dagarna till nivåer ned till ca 20% av halten vid klippning (tabell 3). Vid klippning var halterna rot-DNA högst i de djupare delarna. Vid den okulära besiktningen noterade också att rotmassan var tätare i de djupare delarna.

Tabell 3. Mängd rot DNA (pg per g jord) för respektive dag och delprov efter klippning av grödan

	Nivå, cm	pg DNA per g jord			Medel	Std error
Dag 0	0-20	48307	22751	42051	37703	10877
	20-40	62088	67613	46732	58811	8834
	40-60	92295	72935	75189	80140	8644
Dag 1	0-20	54933	17522	31289	34581	15449
	20-40	19859	18298	18040	18732	804
	40-60	34654	17991	39594	30746	9242
Dag 5	0-20	21861	12802	9030	14564	5384
	20-40	19899	8963	9258	12707	5087
	40-60	16951	12621	10846	13473	2564
Dag 13	0-20	12932	9487	14007	12142	1928
	20-40	5754	9140	9780	8225	1766
	40-60	8186	15556	14528	12757	3259



Figur 3. Förändring av rot DNA på olika nivåer och dagar efter avklippning av gräs

Diskussion

Resultaten visar att tekniken med analys av rot-DNA för bestämning av förekomst av rötter från en gräs tycks fungera relativt väl. Sambandet mellan framdissekerade rötter och DNA-bestämningen varierade mellan gräsdorna med högt r^2 för höstkorn men betydligt lägre för vårkorn. Variation belyser förmodligen problemet med utvinning/utplockning av rötter ur jord snarare än problem med PCR-analysen. Manuell framtagning innebär en risk för förluster av finrötter och att det mycket svårt att skilja på rötter mellan olika arter (Riley et al. 201; Haling et al. 2011; Watt et al. 2008; Oliveira et al. 2000).

Försöksplatsen valdes utifrån att det skulle vara relativt enkelt att rensa fram rötterna. Men det var ändå svårt och tidsödande. Det kan antas att det blir än större problem i en lerjord. En svaghet med denna jämförelse är naturligtvis att inte samma jord kunde användas för fram-plockning av rötter och som för extraktion av DNA. Men utgångspunkten är att placeringen av provsticken minimerat risken för systematiska fel.

Metoder som utnyttjar qPCR är ofta av kostnads skäl utvecklade för att extrahera relativt små prover av växt och jord, exempelvis 0,3-0,5 g jord. Men i denna undersökning har det extraherade jordprovet varit ca 400 g! Dvs i praktiken hela mängden jord som tagits ut med jordborren.

Jordvolymen i rören var begränsad och det var matjord i hela röret ned till 60 cm och rotmängden ökade med djupet, vilket även noterades okulärt vid preparering av proverna (tabell 2). Resultaten från bestämningen av rot-DNA efter avklippning i axgång bekräftar vidare tidigare erfarenheter att det sker en snabb avdödning av rötterna från skördade plantor. I nivå 0-20 cm har rotmängden minskat med 68 %, från 37703 pg till 12142 pg på tretton dagar. Motsvarande minskning i nivå 20-40 är 86 %, från 58811 pg till 8225 pg, och i nivå 40-60 cm 84 %, från 80140 pg till 12757 pg (tabell 2). McKay et.al. (2008) visade på en 80 % nedgång av rot DNA från rajgräs efter 10 dagar efter avdödning vilket stämmer väl med denna undersökning.

Slutsatser

På grund av reducerade resurser kunde inte alla frågor belysas som planerats i undersökningen. Den ursprungliga ansökan innehöll ett tvåårigt projekt med totalbudget på 881 800 kr. Det beviljade beloppet var 409 000 kr utan specifikation på vilka delar projektet skulle innehålla.

Vår slutsats är att metoden är ett mycket intressant verktyg för att bestämma utbredningen av rötter. Provtagningen kan göras med befintlig provtagningsutrustning utan omfattande grävning, och analysen kan göras utan omfattande manuell frampreparering av rötter. Rötternas DNA förstörs relativt snabbt när den ovanjordiska grönmassan avlägsnas vilket medför att risken för att gamla rötter skall komma med i analysen är liten. Specificitet i bestämning med PCR medför att inga andras växter rötter ingår i bestämningen av rot-DNA.

- Metoden är mycket arbetsbesparande jämfört med manuell
- Metoden fungerar väl för att särskilja arter
- Eftersom metoden visat att det bara är ”levande” rötter som detekteras är det ingen risk att få med gamla rötter
- Möjlighet att jämföra sorter och inverkan av packning och markstruktur

Resultatförmedling

Resultaten presenterades vid ÖSF i konferensen den 26 nov 2015 på Vreta kluster som en del av föredraget ” Användning av PCR i växtodlingen ” av Anders Jonsson. En uppsats kommer också att lämnas in till publicering i Plant and Soil.

Resultaten kommer att visas på Hushållningssällskapens konferens 3-4 oktober 2016. Vi planerar att redogöra för projektet på Uddevallakonferensen januari 2017.

Litteratur:

Chun Y. Huang, Haydn Kuchel, James Edwards, Sharla Hall, Boris Parent, Paul Eckermann, Herdina, Diana M. Hartley, Peter Langridge & Alan C. McKay. A DNA-based method for studying root responses to drought in field-grown wheat genotypes *Scientific Reports* 3, Article number: 3194 (2013) doi:10.1038/srep03194

Clark, L.J., Aphale, S.L., & Barraclough, P.B. (2000). Screening the ability of rice roots to overcome the mechanical impedance of wax layers: importance of test conditions and measurement criteria. *Plant and Soil*, 219, 187-196.

FAO. (2006) Guidelines for soil description - FAO. Fourth edition. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Rome,

Haling R.E, Simpsons R.J, McKay A.C, Hartley D, Lambers H, Ophel-Keller K, Wiebken S, Herdina, Riley I.T, Richardson A.E. (2011) Direct measurement of root in soil for single and mixed species using quantitative DNA-based method. *Plant and Soil*, doi: 10.1007/s11104-011-0846-3

Lindén, B. 1979. Alvprovtagning med Ultuna-borren – för markkartering och framtida N-prognoser. Avd. för växtnäringslära, Inst. för markvetenskap, SLU, rapport 119.

Lux A, Rost T.L. (2012). Plant root research: the past, the present and the future. *Annals of Botany* 110: 201-204

Lofqvist, J., W.R. Whalley, and L.J. Clark. (2005) A rapid screening method for good root-penetration ability: Comparison of species with very different root morphology. *Soil plant Sci.* 55:120-124.

McKay A, Riley, J.T., Di Hartley. D, Wiebkin. S, Herdina, Li, G, Coventry. S, Hal, S, Huang, C. (2008). Studying root development in soil using DNA technology: idea to impact. Proceedings of the 14th Australian Agronomy Conference. September 2008. Australian Society of Agronomy www.agronomy.org.au.

Metcalf DB, Williams M, Aragao LEOC, da Costa ACL, de Almeida SS, Braga AP, Goncalves PHL, de Athaydes Silva Junior J, Malhi Y, and Meir P. (2007a). A method for extracting plant roots from soil which facilitates rapid sample processing without compromising measurement accuracy. *New Phytologist* 174: 697-703.

Mommer L, Wagemaker CAM, De Kroon H, and Ouborg NJ. (2008). Unravelling below-ground plant distributions: real-time polymerase chain reaction method for quantifying species proportions in mixed root samples. *Molecular Ecology Resources* 8: 947-953.

Oliveira MRG, van Noordwijk M, Gaze SR, Brouwer G, Bona S, Mosca G, Hairia K (2000) Auger sampling, ingrowth cores and pinboard methods. In: Smit AL, Bengough AG, Engles C, van Noordwijk M Pellerin S van de Geijn SC (eds) *Root methods; a handbook*. Springer- Verlag, Berlin, pp 175-210

Ophel-Keller K, McKay A, Hartley D, Herdina, and Curran J. (2008). Development of a routine DNA-based testing service for soilborne diseases in Australia. *Australian Plant Pathology* 37: 243-253.

Riley IT, Wiebkin S, Hartley D, McKay AC (2010) Quantification of roots and seed in soil with realtime PCR. *Plant Soil* 331:151-163.

Rydberg T & Öckerman T. (1987). Plöjningsfri odling—Dess inverkan på rotutveckling och evaporation. Rapporter från jordbearbetningen. Nr 74, 1987. SLU

Wallenhammar A.C, Almquist C, Redner A, Sjöberg A. 2008. Bomullsmögel i oljeväxter – förbättrad riskbedömning med realtids-PCR. Ingår i: Rapport från växtodlings- och växtskydds dagar i Växjö den 10 och 11 december 2008. Rapport 61. SLU, Södra jordbruksförsöksdistriktet

Watt M, Magee LJ, and McCully ME. (2008). Types, structure and potential for axial water flow in the deepest roots of field-grown cereals. *New Phytologist* 178: 135–146.

Wiklert, P., 1961. Om sambandet mellan markstruktur, rotutveckling och upptorkningsförlopp. *Grundförbättring* 14, 221239.