

Slutrapportering av projektet:

## **Alternativa bekämpningsåtgärder mot potatisbladmögel**

av Sadhna Alström, Doc.; Björn Andersson, Agr. Dr. Inst. för Skoglig mykologi och patologi, Box 7026, 750 07, Uppsala

Extern expert: Eva Twengström, Agr. Dr.

Projekt nr.: V 0533034

### **Introduktion**

Potatisbladmögel orsakas av *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary och är en allvarlig skadegörare i potatisodling över hela världen. I Sverige är sjukdomen en viktig anledning till att odlingsarealen av ekologiskt odlad potatis ständigt minskar. Bekämpning av bladmögel utgör numera ett växande problem också i konventionella odlingsystem, och antalet fungicidbesprutningar per säsong har ökat betydligt under de senaste åren. Trots intensiva bekämpningsprogram fortsätter svåra epidemier av potatisbladmögel att försämra förutsättningarna för en hållbar potatisproduktion av hög kvalitet och kvantitet. Utöver de direkta problemen med produktionen undergräver den höga bekämpningsfrekvensen konsumenternas förtroende för potatis. I detta läge har intresset för biologiska möjligheter till bekämpning *P. infestans* ökat.

I det här rapporterade ettåriga projektet var syftet att utforska möjligheterna att minska angrepp av potatisbladmögel med hjälp av antagonistiska mikroorganismer (bakterier och/eller svampar) i väl kontrollerade odlingsmiljöer. Undersökningar har utförts både i laboratorie, växthus och under fältförhållanden. Målet på lång sikt är att utveckla ett batteri av biologiska komponenter med olika verkningssätt för biologisk bekämpning av bladmögel i fält.

### **Material och metoder**

#### **Laborariestudier**

Mikroorganismerna hämtades från rötter, från komposterat växtmaterial och från mykorrhizasvampar associerade med olika växtarter. Drygt 350 mikrobstammar (svampar, bakterier och aktinomycceter) isolerades enligt utarbetade metoder (Alström, 2000, 2001, Arora et al 2005, Kader et al 2002.). Mikroorganismernas effekter på tillväxt, infektion och symptomutveckling av *P. infestans* i potatis jämfördes med hjälp av flera biotester. Effekten på tillväxt av patogenen undersöktes *in vitro* efter saminokulering, dels på agar och dels i buljong. Isolat som minskade patogen tillväxten kraftigt undersöktes *in vivo* för hämning av både infektion och symptomutveckling på potatisblad och/eller knölskivor. De senare två *in vivo* biotesten kompletterar varandra då antagonister verksamma på knöl inte nödvändigtvis är verksamma på blad. Sammanlagt valdes ca 50 st av 350 mikroorganismer ut för fältstudier. (Bild 1 och 2)

#### ***In vitro***

*På artificiellt odlingsmedie:* Svampar och bakterier odlades upp och saminokulerades därefter med *P. infestans* på ärt-råg agar (ARA) eller ärt-råg buljong (ARB). ARA är ett odlingsmedium speciellt framtaget för att uppföröka *P. infestans*. De *P. infestans* isolat som användes i våra studier bekräftades vara patogena i förtester. Mikroberna på ARB undersöktes med avseende på direkt inverkan på patogentillväxt (beräknad som

torrvikt av total biomassa) medan effekten i form av tillväxthämning av *P. infestans* bedömdes på ARA enligt en skala 0–3 där 0 betyder ingen hämning och 3 betyder stark hämning (Bild 3).

I syfte att förbättra selektionskriterier hos *in vitro* antagonister för fältförsök studerades dels mikrobernas direktverkan på patogenstrukturer med hjälp av ljusmikroskop och dels deras förmåga att utsöndra antimikrobiella ämnen; vätecyanid, fluorescerande sideroforer, cellulaser och kitinaser

### ***In vivo***

*På småblad:* Fullt utvuxna småblad av samma fysiologiska ålder plockades från potatisplantor av sorterna Kind Edward och Bintje odlade i växthus. Bladen förbehandlades med mikrober som visat sig ha antagonistisk verkan i *in vitro* studierna. Ett dygn senare infekterades samtliga blad med *P. infestans* och inkuberades i >95% luftfuktighet vid 14 °C och med ljus under 16 timmar per dygn. Utveckling av bladmögelsymtom jämfördes mellan behandlingar och med kontroll som enbart inokulerats med patogenen.

*På knölskivor:* Noggrant tvättade potatisknölar av King Edward eller Bintje skivades och placerades i sterila skålar på samma sätt som bladen enligt beskrivning ovan. Mikroorganismerna droppinokulerades var för sig ett dygn innan patogenen tillsattes på samma ställe. Utveckling av brunrötesymtom avlästes 4-7 dagar efter inokulering med patogenen.

### **Fältstudier**

Ett kärlförsök utfördes utomhus under sommaren 2005. Kärll (60 cm x 40 cm med en höjd på 30 cm) fylldes med fältjord fria från känd smitta. Jorden kom från ett fält norr om Ultuna. Kemisk analys av fältjord genomfördes av Agrilab, Ultuna. Jordarter bestämdes till nmh Mo med mullhalt 3.0%, lerhalt 10 % och pH 6.3. Övrigt kemiskt innehåll var (mg/100g): P\_Al: 26, Kl V; K\_Al 9.7; Kl III; Mg\_Al 7.8; K/Mg 1.24;



Bild 1-2. Utvalda mikrober (vänster) testas i ett kärlförsök utomhus (höger)

Ca\_Al 199; K\_HCl 84; Kl 2; Cu\_HCl 8.5 mg/kg; P\_HCl 80.1mg/100g. Jorden grundgödslades med ProMagna™ N8 P5 K19 före sättning och under försökets gång regelbundet med Wallco Växtnäring. I detta försök testades 24 av de 50 mikroorganismerna från agar-, blad- och knölestesterna ovan, se bild 2. De tillfördes i peptonvatten. Förgrodda knölar av sorten Matilda behandlades med mikroberna vid sättning (4 knölar

per kärl och 2 kärl per behandling). Ytterligare två appliceringar genomfördes under odlings säsongen också i preventivt syfte men då på bladmassan. Kontroller behandlades med peptonvatten.

Försöket inokulerades med *P. infestans* för att få ett säkert och jämnt bladmögelangrepp. Inokulum gjordes i ordning genom att uppföröka två av *P. infestans* (*Pi 119*, *Pi 46*) på knölskivor. Skivorna sköljdes av och den erhållna suspensionen (ca  $5 \times 10^4$  sporangier per ml + mycelbitar) sprayades på samtliga kärl i tredje veckan av juli då väderet bedömdes gynnsamt för bladmögelangrepp. Infektion och symtomutveckling jämfördes enligt tre metoder i syfte att ta fram den bästa metoden för fortsatta avläsningar.

**Metod 1:** Utveckling av bladmögel avlästes upå samma blad på en bestämd planta under några dagar. Data från fyra plantor per kärl samlades.

**Metod 2:** Antal infekterade små blad ovanifrån per kärl räknades. Data från två kärl per behandling.

**Metod 3:** Symtomutveckling undersöktes genom att bladverk från varje kärl insamlades på likartat sätt och sköljdes i 100ml rent vatten/kärl i syfte att samla sporangier som sedan sparades. Antal sjuka blad räknades per bladverk medan antal sporangier/ml vätska uppskattades med hjälp av ljusmikroskop.

Efter renodling fastställdes de utvalda mikrobernas identitet med FAME och/ eller med molekylärbiologiska metoder enligt Bharadwaj et al (2005, 2007).

## Resultat

### Laborariestudier

Vår studie visade tydligt den antagonistiska potentialen hos drygt 30 % av de testade mikroorganismerna. De antagonistiska mikroorganismerna kom från flera olika källor. Effekten avsåg både infektion, symtomutveckling och patogentillväxt. Ca 16 % av de testade isolaten påvisades ha stark antagonistisk effekt genom hämning av svampens tillväxt (bild 3, tabell 1). Måttlig till stark hämning registrerades hos ca 20 % av samtliga 353 stammar.

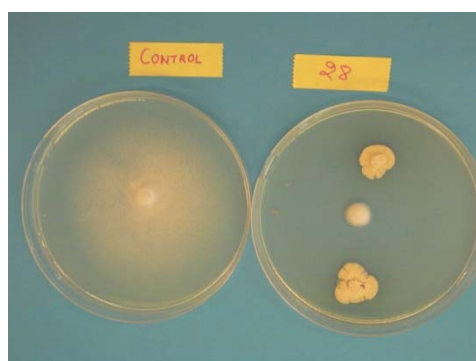


Bild 3: *In vitro* stark hämning av *P. infestans* med antagonist DMB28 . Kontroll till vänster



Bild 4: *In vivo* stark hämning av bladmögel med DMB 28. Kontroll till vänster

Antagonistiska effekter uppmätta *in vitro* (bild 4- 5) bekräftades genom *in vivo* biotester för en del av antagonister. Stark hämning av *Phytophthora*-röta i knölskivor var generellt sett vanligt men hämning av symptom både i blad och knölskivor kunde bekräftas enbart för vissa stammar (t.ex.DMB 28, S 412, S 414). Ljusbildningsundersökningar visade att mikrobernas (e.g. DMB 28, FVC 101, FVC 70) hämmande verkan på myceltillväxt och sporangieproduktion hos *Phytophthora* var beroende av vilken antagonist som patogenen samodlades med. Mycelet var deformerad och hade tömts på sitt innehåll. Ljusbildningsundersökning avslöjade också att hämning av myceltillväxten orsakad av en del antagonister (e.g. FVC 13, FVC 29 and LVC 11) sammanföll med oväntad ökad produktion av oosporer. Detta visade vikten av att tidigt använda flera kriterier vid urval av antagonister för fältstudier (tabell 1).

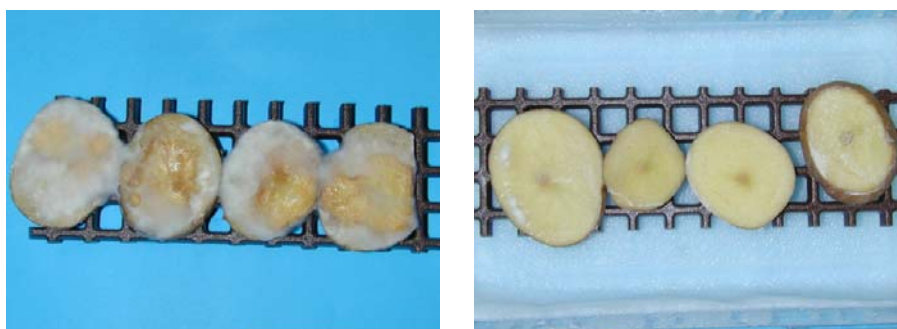


Bild 5: Angrepp i knölskivor (cv King Edward) efter behandling med en antagonist, S 412. Kontroll till vänster.

Tabell 1. Några egenskaper hos utvalda bakterier antagonistiska mot *P. infestans*.

Potential antagonist	<i>In vitro</i> inhibiering av <i>P.i.infes.</i>	Fluor.*	HCN*	Cellulas*	Chitinas*	Effekt på mycel innehåll och produktion av sporangier och oosporer*†
S 412	2	0		1	1	
S 99	3	0		2	2	
S 401	3	0		2	0	
S 21	3	0		0	2	
S 414	3	0		1	2	
AS 14	3	0		2	1	
DMB 18	3	1		1	1	
S 43	3	1		1	2	
S 443	3	0		1	2	
AS 5	3	0		1	2	
AS 9	3	0		1	2	
AS 12	3	0		1	2	
AS 19	3	0		1	2	
FVC 70	3	1	0	0	0	Few sporangia, Empty mycelia
FVC 90	3	0	0	2	0	Oospore
FVC 94	2	0	0	0	3	Few sporangia
FVC 101	2	0	0	0	1	Absent
FVC 110	2	0	0	0	0	
Rhizostar	3	0		1	2	
S 67	3	0		1	0	
LvGm15	3	0	0	0	0	Few sporangia, Few oospore
LVC 2	2	0	0	0	3	Absent
LvGi8	3	0	0	2	0	Few sporangia
LvGi9:1	3	0	0	2	0	Oospore

\*Utsöndring av cellulaser och kitinaser bedömdes enligt en skala; 0 = ingen, 1 = svag, 2 = Moderat och 3 = stark, Utsöndring av fluorescerande ämnen och giftig gas med antimikrobiell verkan HCN bedömdes som 0 = nej, 1 = ja.  
 † Alla tomma rutor – ej testad

## Fältstudier

Av de tre metoderna som jämfördes för att avläsa bladmögelangrepp i kärlförsök, bedömdes Metod 3 som bäst bl.a. för dess objektivitet och tillförlitligheten i symptomavläsning.

Vid symptomavläsningen påvisades förekomsten av bladmögel mycket lägre i olika grad efter behandling med ca hälften av testade 24 isolat än i kontrollkärlen. Men signifikant lägre angepp avlästes i kärnen som behandlades med isolaten S 412, S99, S 414 och AS 14 (Fig 4 och Bild 5). Fyra andra isolat (e.g. AS 5) visade ingen hämning alls.



Bild 5. Hämning av bladmögelangrepp efter behandling med isolat S 412 (höger) jmftr kontroll (vänster).

Den lägre förekomst av bladmögel visades bero på signifikant låga antalet sporangier som bildades på blad/ planta efter behandlingar med AS 14, S 412, S 414, men inte med S 99.(Fig 5). Hämning av sporangiebildningen märktes för flera isolat (t.ex. S 64) men det var inte statistiskt signifikant. Orsaken bakom lägre antal infekterade blad behandlade med S 99 verkar vara annat än hämning av sporangiebildning. I vissa fall, t.ex. AS 5 som hade ingen skyddseffekt mot bladmögelsymptom men antal sporangier som bildades var oväntat lågt på bladen. (Fig 5).

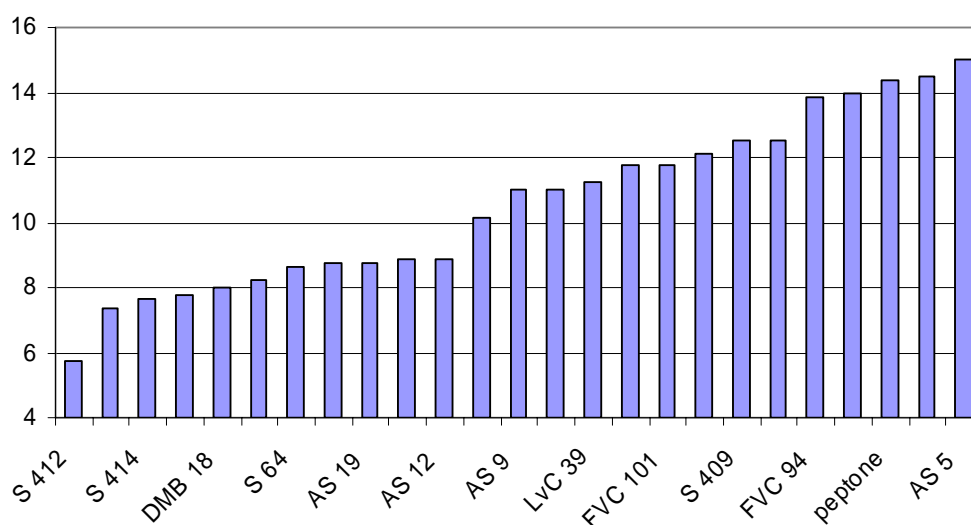


Fig. 4. Bladmögelangrepp i Matilda efter behandling med 24 olika mikrober.(METOD 3). Y axel - Antal blad med symptom utav 25 per planta (n= 8 plantor)

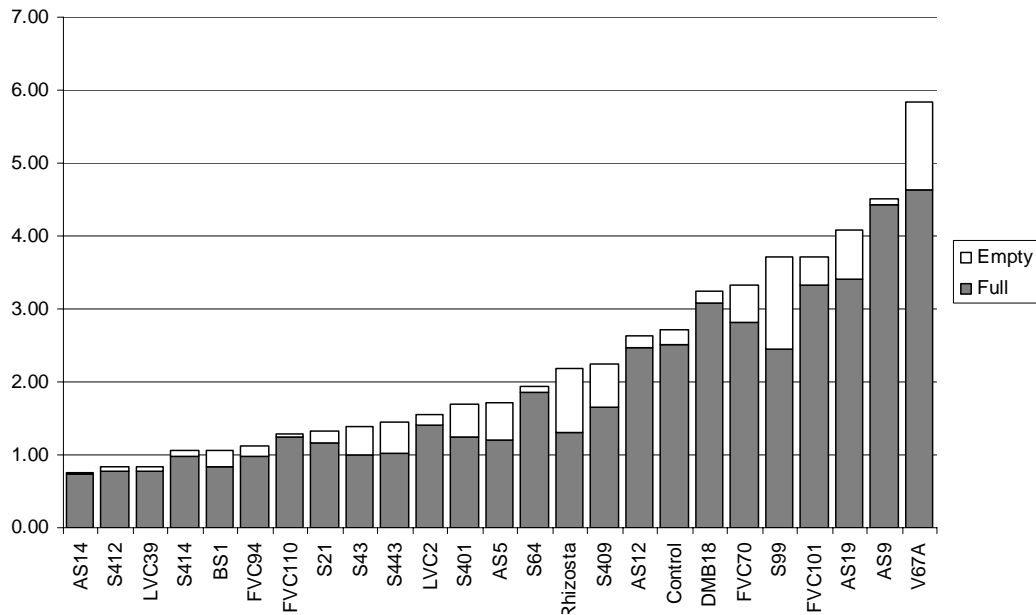


Fig 5. Sporangieproduktion per 100 blad efter mikrobbehandling (n=2) med 24 mikrober.

### **Identifiering av mikroorganismer**

De bladmögelhämmande bakterier visades tillhöra flera släkten. De vanligaste var *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* och *Serratia*.

Isolat S 99, S 414 och S 412 = *Serratia* sp.

S 64 = *Pseudomonas* sp.

LVC-2 = *Stenotrophomonas maltophila*

FVC-110 = *Arthrobacter ilicis*,

Svampar identifierades främst morfologiskt och visades tillhöra bl.a. *Trichoderma* sp., *Beauveria bassiana* (en insektsantagonist).

### **Övrigt**

Ytterligare en alternativ skyddsåtgärd mot potatisbladmögell studerades som inte ingick från början i projektet. En pilotstudie utfördes i samarbete med en kanadensisk stipendiat, M.Sc. A. Puentes. Effekten hos olika komposterade örter undersöktes mot *P. infestans*. I studien ingick björk, maskros, salvia, åkerfräken och rölleka. Extrakt av växterna tillsattes patogenkultur *in vitro*. Hämmningseffekten undersöktes även mikroskopiskt med avseende på inverkan på patogenens sporangier och mycel. Delar av resultat erhållna från denna studie framgår av Fig. 6. Puentes studie visade en stark hämning av både myceltillväxt (figur 6, bild 7) och sporangiebildning (bild 6) efter behandling med en del komposterade örter

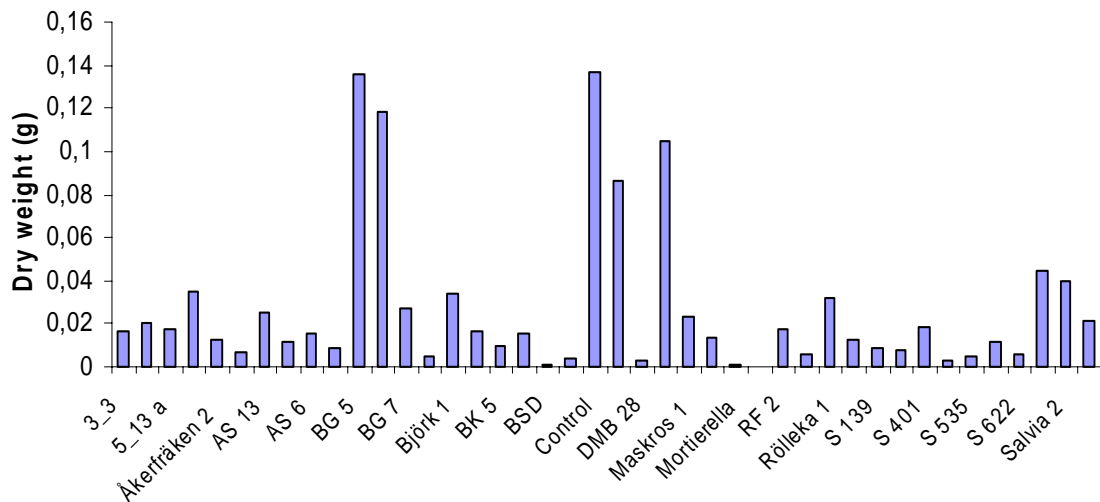


Fig. 6. *In vitro* inverkan av antagonistiska mikrober uppmätt som mycelvikt i g/brunn, (n = 4). Effekt av olika örtextrakt på *P. infestans* (46) framgår också här.

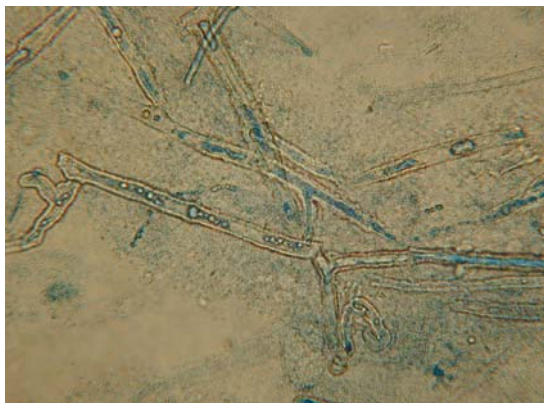


Bild 6. Hämning av patogentillväxt efter behandling med björkextrakt. Mycelet är tomt på sitt innehåll

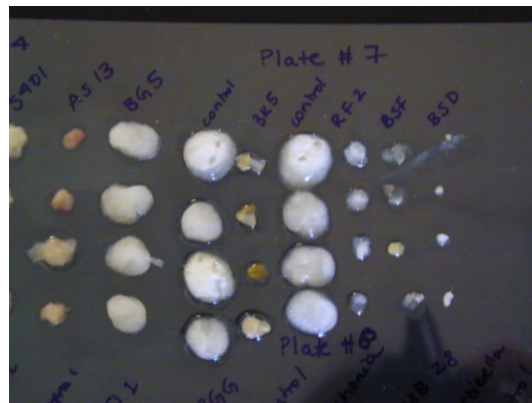


Bild 7. Stark tillväxthämning av patogenen efter behandling med antagonister; AS 13, BK 5, RF2, BSF och BSD.

Vår samlade bedömning är att vissa örter och andra med liknande effekt är intressanta för ytterligare undersökningar med avseende på kontroll av bladmögel. Särskilt angeläget är att utvärdera synergistiska effekter mellan vissa örter och de bästa antagonistiska mikroorganismerna eller kanske till och med konventionella fungicider.

## Slutsatser

Syftet med projektet var att utforska möjligheterna att minska angrepp av potatisbladmögel med hjälp av antagonistiska mikroorganismerna (bakterier och/eller svampar) i väl kontrollerade odlingsmiljöer. Våra undersökningar visar att naturligt förekommande mikrobiella antagonister har en tydlig fördröjande effekt på potatisbladmögel. De tillhör flera släkter. Minst fyra mikroorganismerna: AS 14, S 412, S 414 och S 99 (tre av dessa tillhör släkten *Serratia*) visade sig ha antagonistisk förmåga både i laboratorie- och fältmiljö. De observerade effekterna verkar bero på störningar i skadesvampens stukturer. Vi provade dock endast en dos av antagonisten, ett fåtal appliceringar, ett begränsat urval av patogenstammar och en potatissort. Flera fältundersökningar behöver utföras med flera doser, appliceringar, antagonist-kombinationer och flera potatissorter för att säkerställa tillförlitligheten av de verkamma antagonisterna. Viktigt är

också att utföra fältstudier dels på resterande 26 isolat (delar av resultat from in vitro studier redovisats i figur 6) och dels på DMB 28 som visats vara en stark antagonist (bild 3 och 4) i våra tidigare studier. DMB 28 är en aktinomycet och vi har haft svårigheter med att hantera dess uppförökning på ett tillfredställande sätt ända till slutet av projektiden. Den är värt att testa enskilt och i kombination med andra.

## Referenser

- Alström S. 2001. Characteristics of bacteria from oilseed rape in relation to their bio-control activity against *V. dahliae*. Journal of Phytopathology. 149, 57-64
- Alström S. 2000. Root colonising fungi from oilseed rape and their inhibition of *Verticillium dahliae*. Journal of Phytopath. 148, 417-423
- Arora T, Eklind Y, Rämert B and Alström S. 2005 Microbial analysis of composts and test of plant pathogen antagonism of municipal and farm composts. Biological Agric. and Hort. 22, 349-367.
- Bharadwaj Dharam P., Per-Olof Lundquist, Paula Persson and Sadhna Alström: Antagonistic activity of bacteria from spores of arbuscular mycorrhizal fungi against potato pathogens . Abstract to “Asian Conference on Emerging Trends in Plant-Microbe Interactions”. Chennai, India. December 08-10, 2005.
- Kader M. A. and Alström S. Bacteria from arbuscular mycorrhiza and their anti-fungal activity against soil-borne plant pathogens. 8<sup>th</sup> New Phytologist Symposium (NPS 2002), June 9-14, 2002, Infocenter at the Viikki Biocenter, Helsinki, Finland.
- Hedenskog, A, Andersson B, Twengstrom E and S Alström: Biological activity in mycorrhiza associated bacteria in relation to *Phytophthora infestans* in potato. Abstract to “Asian Conference on Emerging Trends in Plant-Microbe Interactions”. Chennai, India. December, 08-10, 2005.



## Resultatförmedling

- Alström S, E Twengström och B Andersson Performance of antagonistic fungi and bacteria in vitro and in vivo in controlling potato late blight. Manuscript under preparation.
- Bharadwaj D. P., P.Olof.Lundquist and S. Alström 2007. Interaction of arbuscular mycorrhizal spore associated bacteria with potato, oilseed rape and potato pathogens. Submitted
- Hedenskog A, Andersson B, Twengström E and Alström S .2007. Biological activity of bacteria associated with arbuscular mycorrhiza spores in relation to antagonism towards *Phytophthora infestans* in potato. Submitted
- Alström S, B Andersson och E Twengström. Möjligheter till biologisk bekämpning mot potatisbladmögel. Potatisdag den 31 mars 2006. SLF, Stockholm
- Bharadwaj, D.P., Lundquist, P.O. and Alström, S. Bacteria associated with arbuscular mycorrhizal spores and their influence on growth of mycorrhizal and non-mycorrhizal plants. Abstract to ICOM 5, Granada on 23-27<sup>th</sup> July 2006
- Bharadwaj D. P., Lundquist, P.O. Persson. P. and Alström, S. Antagonistic activity of bacteria from spores of arbuscular mycorrhizal fungi against potato pathogens . Abstract to “Asian Conference on Emerging Trends in Plant-Microbe Interactions”. Chennai, India. December 08-10, 2005.
- Hedenskog, A, Andersson B, Twengstrom E and S Alström Biological activity in mycorrhiza associated bacteria in relation to *Phytophthora infestans* in potato. Abstract to “Asian Conference on Emerging Trends in Plant-Microbe Interactions”. Chennai, India. December, 08-10, 2005.