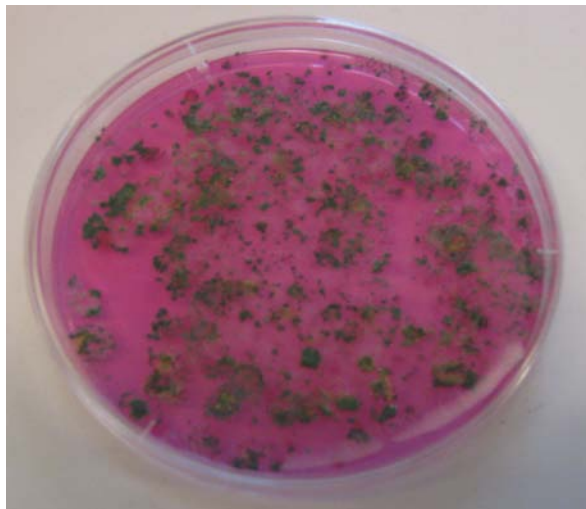




## Slutrapport angående projektet

**”Samspelet mellan odlingssubstrat och det biologiska bekämpningsmedlet Binab T i slutna odlingsystem” med (ärendenummer 325)**



*Sammar Khalil*

*Department of Horticulture, SLU, Box 103, 230 53 Alnarp, E-mail: sammar.khalil@ltj.slu.se*



## **Projektets syfte och mål**

Målsättning med projektet avser optimering av förhållande i odlingssubstrat för en effektiv bio-bekämpning av vanliga rotsjukdomar i slutna hydroponiska odlingsystem med hjälp av Binab T. Fokus är på sambandet mellan vattenhalt i odlingssubstrat och verkningsgrad hos det biologiska bekämpningsmedlet.

## **Slutsatser**

De uppnådda resultaten visade på att

- Mängd patogen samt Binab T ökar med ökad vattenhalt
- Den antagonistiska potentialen hos Binab T kan uppnås vid både låg och hög vattenhalt.
- Enzymaktiviteter i odlingsystem varierar med varierad vattenhalt.
- Planttillväxt ökar i närvaro av BinabT och vid ökad vattenhalt
- Den naturliga mikrofloran i odlingsystemet påverkas av patogen tillsatts, Binab T samt vattenhalten i odlingssubstrat. Indikation på en antagonistisk effekt hos den mikrofloran kan också noteras

## **Resultatförmedling och publikationer**

Information om projektet presenterades på hemsida för gruppen "Mikrobiell Hortikulture", hemsidan för forskarskolan "MicroHort" samt på hemsidan för "Växtskydds Alnarp".

Resultaten från projektet presenterades i

### 1- Nationella publikationer

Khalil S. & Alsanius B.W. 2009. Biologiskt vapen mot rotskadegörare. Viola nr 20

### 2- Internationella Publikationer

Khalil S. Alsanius B.W. 2010. Growing medium water content and biological control in closed hydroponic system" Inskickas snart till Crop Protection"

Resultaten presenterades också i ett seminarium för Hortikultur gruppen. Dessutom kommer forskningsresultat att presenteras för odlare och rådgivare vid ett odlarmöte i maj- 2010



## Bakgrund

Slutna odlingssystem utgör ett miljövänligt alternativ för att minska utsläpp av näringsberikat vatten från växthus och därmed minska övergödning av vattendrag, sjöar och kustnära områden. Emellertid ökar recirkulering av näringslösning risken för spridning av rotpatogener. Denna spridning kan bero på flera faktorer bland annat kulturens mottaglighet till vissa patogener, om systemet är substratlöst eller substratbaserat, substratets natur (organisk eller inert) samt odlingsbetingelser. Svamparter inom släkten *Pythium*, *Phytophthora* och *Fusarium* bedöms oftast vara dominerande patogener i slutna odlingssystem. Deras sjukdomsangrepp varierar från bruna rotspetsar till mörkfärgade ruttet rotsystem.

En stor insats har utförts för bekämpning av rotsjukdomar med hjälp av biologiska åtgärder. Många studier har visat förmågan hos biologiska bekämpningsmedel att främja tillväxt, bryta ner organiska ämnen samt motverka sjukdomar. Mekanismer bakom den antagonistiska hos dessa mikroorganismer omfattar konkurrens, mykoparasitism, antibiosis, produktion av sekundära metaboliter såsom antibiotika, sideroforer eller produktion av exoenzymer som bryter ner de stora komponenter i svampens cellvägg. Den sistnämnda verkningsmekanismen är typisk för biologiska bekämpningsmedel baserade på *Trichoderma* spp.

Vid Området Hortikultur, SLU, Alnarp pågår forskning kring bekämpning av rotsjukdomar i slutna odlingssystem. Olika mikroorganismer med antagonistisk effekt, kommersiella preparat (Binab T, Mycostop och Gliomix) eller naturligt förekommande och isolerade från odlingssystem (*Pseudomonas fluorescens* 5.014), utvärderas för deras förmåga att hämma sjukdomsalstrare såsom *Pythium*-, *Fusarium*- och *Phytophthora*-svampar. *Pseudomonas fluorescens* 5.014 är en bakterieisolaten som isolerades från tomatrötter och har visat båda tillväxtfrämjande och antagonistisk effekt mot rotpatogenerna *Pythium ultimum* var. *ultimum*. Kommersiella preparaten innehåller antingen svampar eller bakterier som aktivt ämne. De är tillåtna i Sverige för bekämpning av svampangrepp i odlingar av bland annat grönsaker och prydnadsväxter i växthus med öppna system samt mot jordburna patogener. Binab T, ett biologiskt bekämpningsmedel baserat på nyttosvampar *Trichoderma* och innehåller *Trichoderma harizianum* och *T. polysporum*.

I tidigare undersökningar har vi sett att behandlingstidpunkten och tidsmarginalerna är väsentliga för tillsats av bekämpningsmedel. Medlens effekt varierade beroende på typ av odlingssystem (näringslösning- eller substratbaserade system), typ av patogen som finns i systemet, antal medel som verkade samtidigt samt val av substrat. Binab T visade jämfört med andra kommersiella biologiska bekämpningsmedel en god effekt mot olika rotsjukdomar vid odling i torv, medan effekten i pimpsten var varierande. Få tomatodlare använder dock torv som odlingssubstrat idag. Vattenhalt i substratet bedömdes som en väsentlig skillnad mellan substraten. I tidigare undersökningar har substratets fuktighet visat sig vara avgörande för tillväxt och spridning av båda sjukdomsalstrarna och biologiska bekämpningsmedel. Dessa studier har visat att ökat vatteninnehåll i odlingsmedia har en positiv effekt på tillväxt av de antagonistiska svampar tillhörande svampgruppen *Trichoderma*. Detta betyder att en bevattningsstrategi som gynnar båda tomatkulturen och Binab T skulle kunna öka preparatets effekt och tillförlitlighet mot vanliga rotsjukdomar i tomat.

## Genomförande

Projektet utfördes under 2009. Tomat användes som modellväxt och *Pythium ultimum* som modellpatogen. Undersökningarna utfördes i klimatkammare. Plantorna odlades i sju veckor i krukor med pimpsten som odlingssubstrat. I försöken ingick fyra behandlingar:



- Behandling 1: kontroll (utan patogen och utan Binab T),
- Behandling 2: med tillsats av bara patogen,
- Behandling 3: med tillsats av bara det biologiska bekämpningsmedlet Binab T
- Behandling 4: med tillstas av båda patogen och Binab T.

Varje behandling omfattade ett eget slutet system som bestod av fyra krukor, 100L dunk och en pump. Varje hink omfattade två tomatplantor. Droppbevattning användes. Med hjälp av pumpen cirkulerade näringslösningen från dunken till hinkarna och genom slagsystemet som är kopplat till dessa hinkar cirkulerade resten av näringslösning tillbaka till den stora dunken (Figur 1). Varje behandling testades vid två vattenhaltsnivåer, 50% respektive 70%. Substratfuktighet reglerades genom reglering av droppbevattning. För substratfuktighet på 50% och 70% pumpades 1,9 respektive 2,3 liter näring i varje hink 2 gånger om dagen. Förloppet av varje bevattning pågick i 15 min. Fuktigheten mättes en gång per dag hjälp av en Time-domain-reflektometri (TDR) mätare.

Binab T tillsattes i systemet som 1% suspension. En mängd på 20 ml tillsattes i varje hink (i behandling 3 och 4) en gång per vecka under odlingsperiod. Rotpatogenen *Pythium ultimum* tillhör svampgruppen Oomyceter som infekterar plantor med hjälp av zoosporer. Zoospor produktion utfördes genom odling av svampen på vatten agar i två dagar och sedan i V8 lösning (grönsaksblandning) i ytterligare två dagar. Därefter tvättades mycelet två gånger med näringslösning bestående av 0.145 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.012 g  $\text{MgSO}_4$ , 0.099  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  och 0.016  $\text{FeCl}_3$  per liter och en gång med vatten. En mängd på 20 ml av zoospor suspensionen tillsattes i varje hink (behandling 2 och 4) en gång per vecka och fyra dagar efter tillsats av biologiska bekämpningsmedel.

**Figur 1.** Slutna odlingsystemet som användes i försöken



## **Analys**

Följande analyser ingick i projektet:

### \* Mikrobiologiska analyser

Dessa analyser omfattade förekomsten av patogenen, de aktiva ämnena i Binab T samt den naturliga mikrofloran (allmänna bakterie- och svampflora, fluorescerande Pseudomonader och det allmänna *Trichoderma* svampar) och bedömdes genom bestämning av levande cellhalt på selektiva medier.

### \* Bedömning av verkningsgraden av de valda biologiska bekämpningsmedlen

Den antagonistiska potentialen hos Binab T bedömdes genom mätning av enzymaktiviteter. I proverna mättes produktion av cellulaser,  $\beta$ -1,3-glucanaser, xylanaser och kitinaser som mått på verkningsmekanism av BinabT.

\* Växtpatologiska parametrar

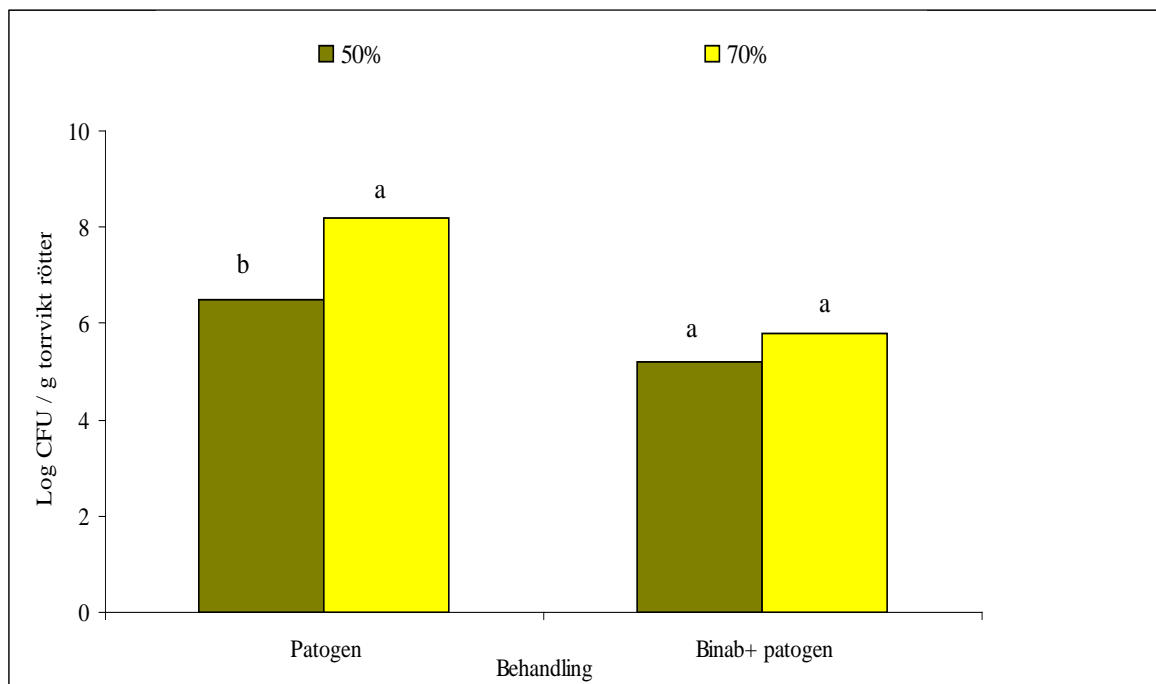
Förekomsten av rotskador med skala 1-5; 1= vita fina rötter, 2= mörkfärgade rotspetsar, 3= mörkfärgade enskilda rötter, 4= mörkfärgade rotpartier och 5= totalt missfärgade rotsystem utfördes en gång i vecka under odlingsperiod samt vid skörden,

\* Odlingsrelaterade parametrar

Plantornas tillväxt och utveckling registrerades en gång per vecka. Vid skörden registrerades bladskärm, rotstorlek, skottlängd och skott- och rotbiomassan (torr- och färskvikt).

**Resultat och diskussion**

Efter odling i sju veckor i klimatkammare har resultaten visat en ökning i mängd patogen med ökad vattenhalt i substratet (Figur 1). Förmågan hos Binab T att minska mängd patogen i odlingssystem har däremot visat sig vara effektiv i båda vattenhaltsnivåer. Detta indikerades också genom minskning av rotskador i behandling 4 där båda BinabT och patogenen tillsattes i systemet (Tabell 1).



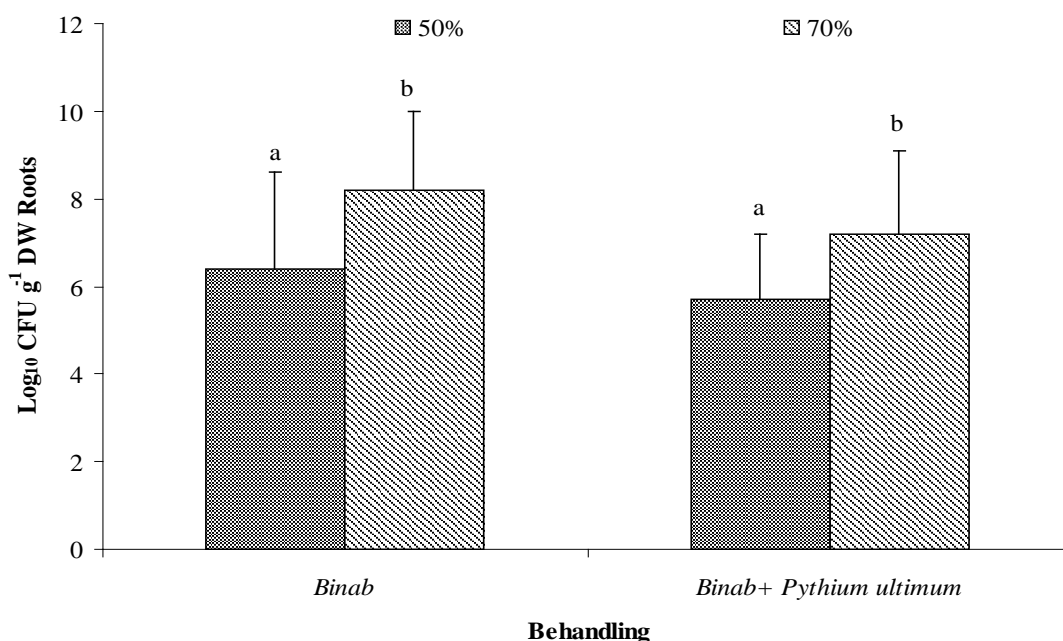
**Figur 1.** Förekomst (log CFU/g rottorrsvikt) av rotpatogenen, *Pythium ultimum*, på tomatrötter med och utan tillsats av biologiska bekämpningsmedel Binab T. Tomatplantorna odlades i pimpsten vid vattenhalt 50% respektive 70%

**Tabell 1.** Förekomsten av rotskador på tomat rötter odlade i sju veckor i slutna odlingsystem. Plantorna odlades i pimpsten vid vattenhalt 50% respektive 70% och bedömning utfördes på skala 1-5; 1= vita fina rötter, 2= mörkfärgade rotspetsar, 3= mörkfärgade enskilda rötter, 4= mörkfärgade rotpartier och 5= totalt missfärgade rotsystem

Treatment	Water content	
	50%	70%
A (negative Control)	0	0
B (positive control)	2.9 ± 0.6a	3.6 ± 0.8a
C (Binab)	0	0
D (pathogen + Binab)	1.2 ± 0.5b	1.8 ± 0.4b



De uppnådda resultaten visade också en ökning i mängd Binab T med ökad vattenhalt i substratet (Figur 2). Ökning av mängd patogen och Binab vid ökad vattenhalt har också indikerats i andra studier. Minskning av mängd patogen vid båda vattenhalten indikerar däremot att den antagonistiska potentialen hos Binab är oberoende av vattenhalten.



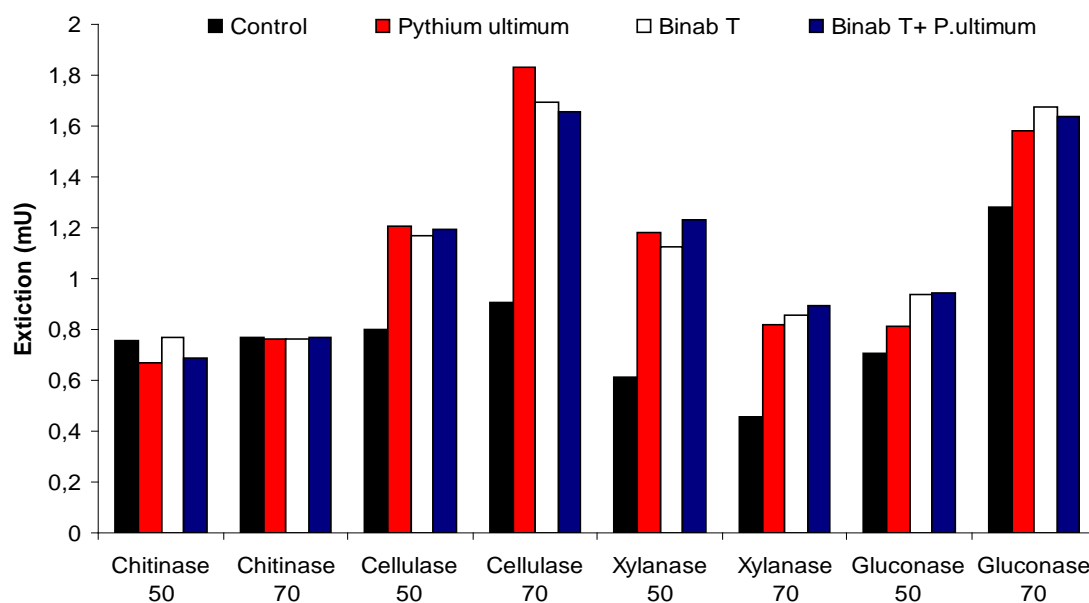
**Figur 2.** Förekomst (log CFU/g rottorrsvikt) av *Trichoderma* isolat i Binab T på tomatrötter med och utan tillsats av rotpatogenen, *Pythium ultimum*. Tomatplantorna odlades i pimpsten vid vattenhalt 50% respektive 70%

Den antagonistiska potentialen hos Binab T undersöktes också med fokus på enzymaktiviteter. Produktion av enzymer cellulaser, kitinaser, xylanaser och glukonaser mättes i slutet av odlingsperioden visade ingen skillnad i kitinasaktiviteten verken mellan behandlingar eller mellan vattenhalten (Figur3). Aktiviteter av cellulaser och glukonaser ökade i behandlingarna med och utan rotpatogen samt med och utan Binab T jämfört med kontrollen. Denna ökning var också korrelerat med ökad vattenhalt. Cellulosa och glukon är cellväggs komponenter som förekommer hos de flesta svampar med bland annat Oomyceter. Högre Aktiviteter av dessa enzymer i de behandlingarna med BinabT indikerar produktion av dessa enzymer av Binab T för att spjälka patogenens cellvägg. Ökad aktivitet av dessa enzymer med ökad vattenhalt är ytterligare en indikation på produktion av dessa enzymer av Binab T vars mängd ökar vid ökar vattenhalt. Dessutom indikerar resultaten på korrelation mellan aktiviteter av dessa enzymer och ökad patogen mängd. Ökad produktion av dessa två enzymer i behandling med bara patogen kan också indikera biokontroll aktivitet hos den naturliga mikrofloran mot rotpatogenen.

Kitin är en cellvägg komponent som saknas hos Oomyceter och detta kan vara förklaring till lägre kitinasaktiviteter i alla behandlingar i jämförelse med de andra enzymer.



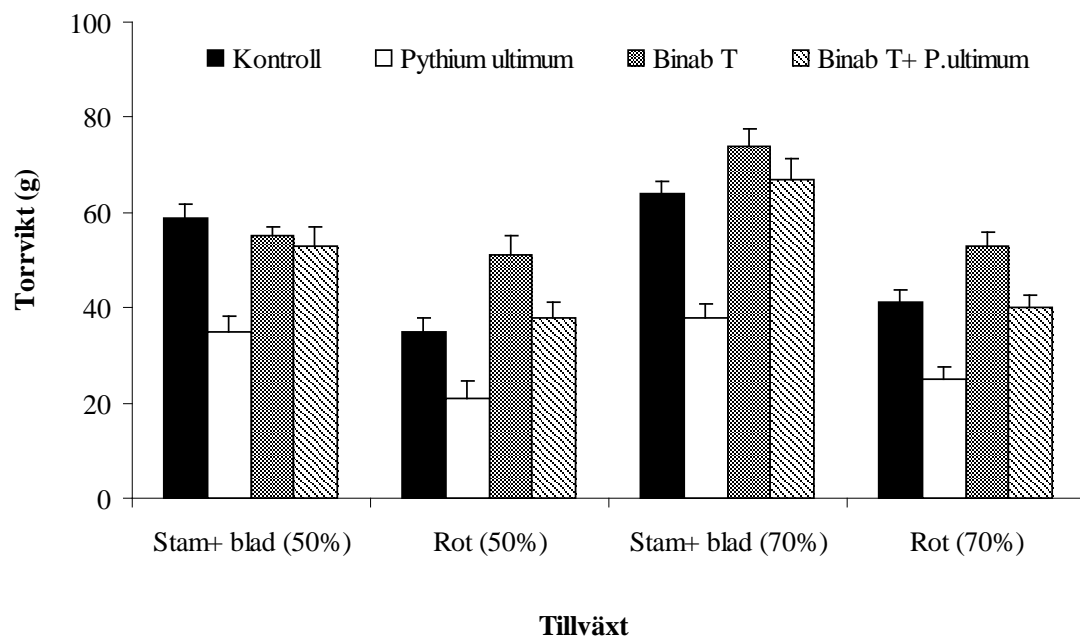
Skillnad i xylanas aktiviteter kunde också indikeras mellan behandlingarna. Produktionen var högre i behandlingarna med och utan patogen eller med och utan Binab i jämförelse med kontrollen. Xylanasaktiviteter var till skillnad från cellulas och glukonas högre vid lägre vattenhalt.



**Figur 3.** Aktiviteter hos olika enzymgrupper i hydroponiska odlingsystem efter tillsatts av biologiska bekämpningsmedel i och utan närvaro av rotpatogenen *Pythium ultimum*.

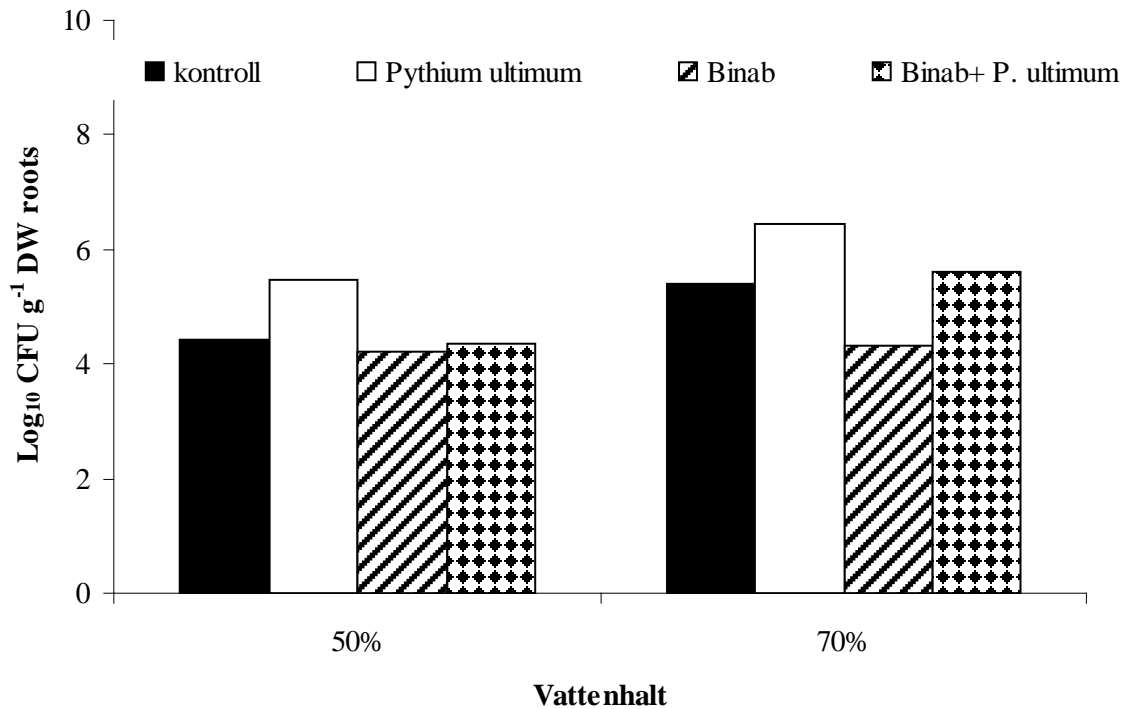
Ytterligare visade undersökningarna att rot- blad- och stamvikt ökade i behandlingen med Binab T vid ökad vattenhalt i jämförelse med kontrollplantor (Figur 4). Vid minskat vattenhalt har Binab T visa positive effekt på rotvikt men inga skillnader indikerades för blad- och stamvikt.





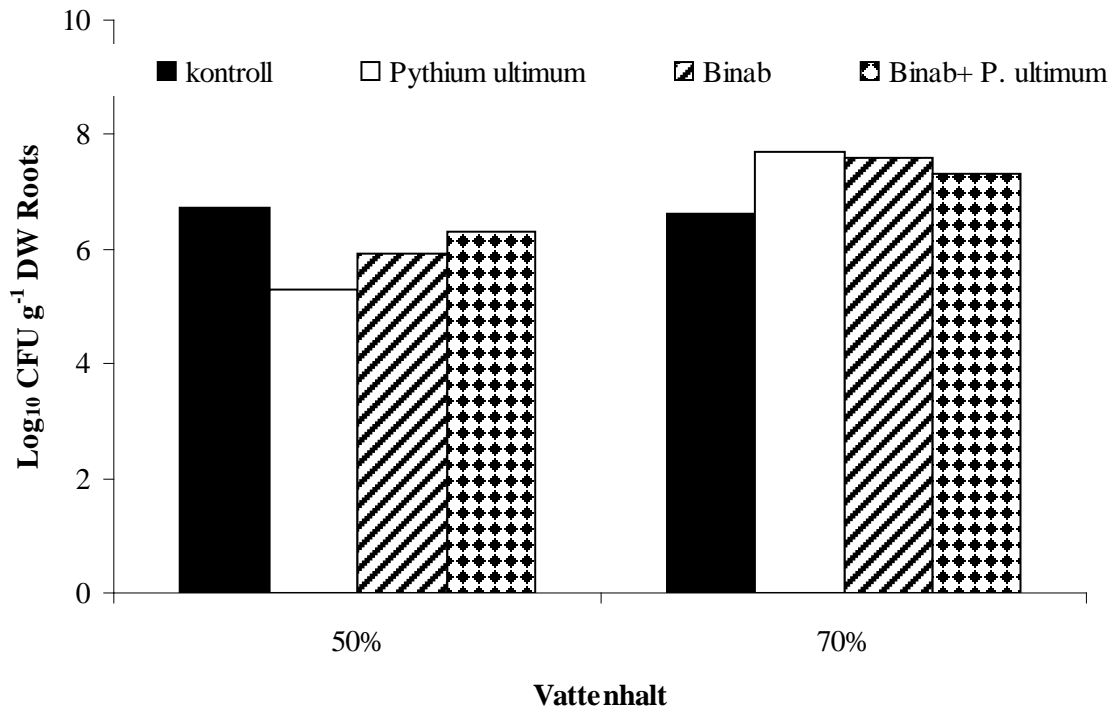
**Figur 4.** Effekt av Binab T och rotpatogenen *Pythium ultimum* på rot-, skott- och bladsvikt hos tomat odlade i slutet hydroponiskt odlingsystem.

Mängd fluorescerande pseudomonader ökade i behandlingar med enbart patogen i jämförelse med kontrollen (Figur 5). Ökad rotskada vid patogenangrepp ökar läckage av rotexudat från rötter vilket kan förklara ökad mängd pseudomonader i systemet. Mängd allmänna mikrofloran ökade i de behandlingarna med patogen eller Binab T tillsattes enskilda eller kombinerade. Den ökningen var också relaterad till ökad vattenhalt. Vid lägre vattenhalt minskades mängd bakterier i dessa behandlingar jämfört med kontroll (Figur 6). Dessa resultat indikerar effekten av patogenen, biologisk bekämpningsmedlet samt den fysikaliska faktorn i substratet (vattenhalt) på den allmänna mikrofloran i systemet.

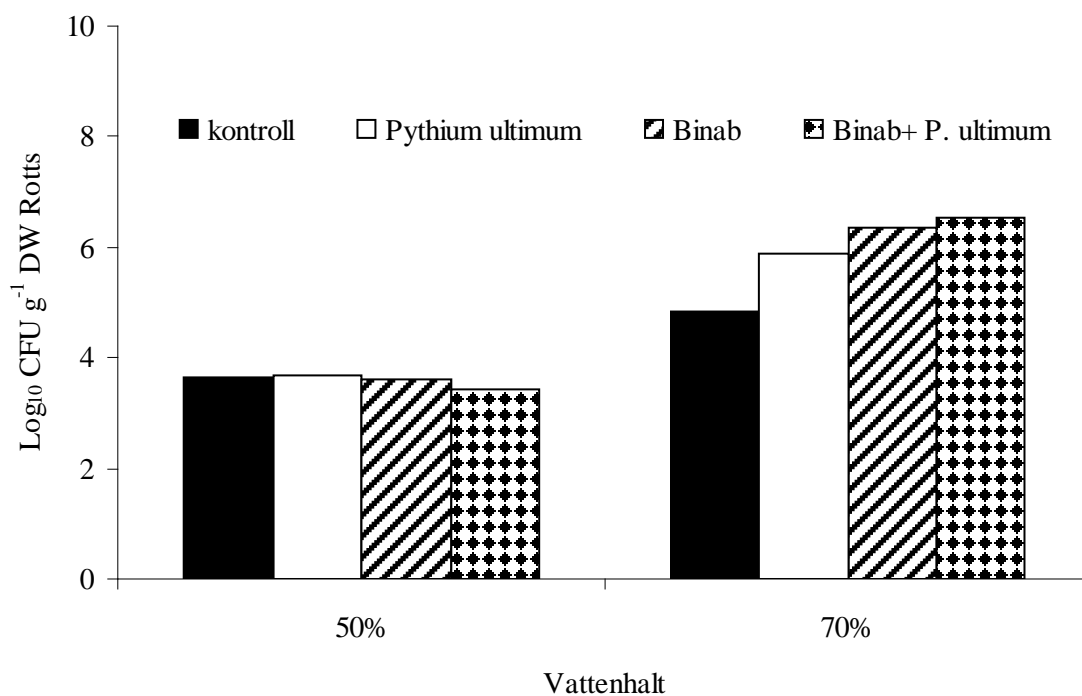


**Figur 5.** Förekomst (log CFU/g rottorrsvikt) av fluorescerande pseudomonader på tomatrötter i och utan närvaro av rotpatogenen, *Pythium ultimum* eller biologiska bekämpningsmedel Binab T. Tomatplantorna odlades i pimpsten vid vattenhalt 50% respektive 70%

Förekomsten av den allmänna svampfloran i systemet påverkades också av de biologiska och fysikaliska faktorerna i substratet. Vid ökad vattenhalt ökade mängden svampar i de behandlingarna med patogen eller Binab jämfört med kontrollen (Figur 7).



**Figur 6.** Förekomst (log CFU/g rottorrsvikt) av den allmänna bakteriefloran på tomatrötter i och utan närvaro av rotpatogenen, *Pythium ultimum* eller biologiska bekämpningsmedel Binab T. Tomatplantorna odlades i pimpsten vid vattenhalt 50% respektive 70%



**Figur 7.** Förekomst (log CFU/g rottorrsvikt) av den allmänna svampfloran på tomatrötter i och utan närvaro av rotpatogenen, *Pythium ultimum* eller biologiska bekämpningsmedel Binab T. Tomatplantorna odlades i pimpsten vid vattenhalt 50% respektive 70%

### Slutsatser

Sammanfattningsvis visar resultaten att

- Mängd patogen samt Binab T ökar med ökad vattenhalt
- Den antagonistiska potentialen hos Binab T kan uppnås vid både låg och hög vattenhalt.
- Enzymaktiviteter i odlingsystem varierar med varierad vattenhalt.
- Planttillväxt ökar i närvaro av BinabT och vid ökad vattenhalt
- Den naturliga mikrofloran i odlingsystemet påverkades av patogen tillsatts, Binab T samt vattenhalten i odlingssubstrat. Indikation på en antagonistisk effekt hos den mikrofloran kunde också noteras

### Framtiden

Effektivare bekämpning av rotpatogener med hjälp av Binab T förutsätter också en ökad kunskap om samspelet mellan det preparatet och andra odlingsfaktorer i odlingsystemet. Dosering av båda bekämpningsmedel och patogen är ytterligare en aspekt som behövs undersöka. Rollen av den naturliga mikrofloran och dess interaktioner med rotpatogener respektive bekämpningsmedel är också av stor betydelse vid utveckling av hållbara och effektiva bekämpningsstrategier mot rotsjukdomar i hydroponiska odlingsystem.

## Ekonomisk redovisning

Kostnader under projektets förlopp är redovisade enligt följande:

	Sökta medel från Partnerskap	Kostnader för projektet
<i>Arbets tid (Sammar Khalil)</i>	79400	79400
<i>Analyser</i>	14000	14200
<i>Material</i>	30100	30000
<i>Hyra av klimatkammare</i>	24000	24000
<i>Publikationskostnader</i>	2500	2500
<b>Total Summa</b>	<b>150000</b>	<b>150100</b>

Binabs del i projektet omfattade egen arbetstid. Totala antal timmar som ingick i Binabs arbetstid var 312 timmar enligt följande:

Antal timmar	Jan	Feb	Mars	April	maj	Juni	Juli	Agust	Sept	Okt	Nov	Dec	Totalt
<i>Sådd</i>	4		4					4		4			16
<i>Plantering</i>	8		8					8		8			32
<i>Avläsning</i>		4	16	16					4	16	16		72
<i>Skörd</i>			8	8						8	8		32
<i>Labbarbete</i>			40	40						40	40		160
<b>Totalt</b>	<b>12</b>	<b>4</b>	<b>76</b>	<b>64</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>4</b>	<b>76</b>	<b>64</b>	<b>0</b>	<b>312</b>