

Sjukdomsbekämpning i ekologisk tomatproduktion – kombinerad biologisk bekämpning med mikroorganismer och sanerande växter

*Disease control in organic tomato production – combined biological control
with microorganisms and biofumigation*

Hanna Friberg, Christoffer Berner och Niklas Samils, Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi, SLU.

Anna Mårtensson, Institutionen för mark och miljö, SLU.

Birgitta Rämert, Institutionen för växtskyddsbiologi, SLU.

Kristina Homman, Länsstyrelsen i Dalarnas län.



Symptom av korkrot på tomatrötter. Foto: Hanna Friberg

Sammanfattning

Jordburna växtpatogener och de sjukdomar de orsakar är ett stort problem i ekologisk tomatproduktion och anses vara en av de viktigaste orsakerna till att det ofta är lägre skördar i ekologisk produktion än i konventionell. Här har vi utvärderat möjligheterna att använda olika biologiska bekämpningsstrategier för att mildra problem med rotsjukdomar på tomat: bioångning med hjälp av tillfört malt senapsmjöl och tillsättande biologisk bekämpning med ett preparat baserat på Trichoderma spp. Jord från olika gårdar med växthusproduktion av tomater användes i försök där jorden behandlades och biotestplantor av tomat odlades för analys av effekter på rot- och skotttillväxt, missfärgning av rötter och effekter på svampsamhället på rötter. De allvarligaste rotproblemen i de jordar som undersöktes var korkrot, orsakad av Pyrenochaeta lycopersici typ 2. Vi såg att effekten av bioångning varierade mellan jordar från olika gårdar. Överlag hade behandlingen en positiv effekt på rot- och skotttillväxt. Sjukdomshämningen var tydligast i jordar med svåra problem med korkrot. En gynnsam effekt på rottillväxten var inte lika tydligt kopplad till sjukdomsproblematik, utan syntes även i en jord med mycket begränsade sjukdomsproblem. Behandling av jorden med Trichoderma spp. gav ingen gynnsam effekt på sjukdomshämning eller rottillväxt. En kombination av Trichoderma spp. och bioångning gav i ett fall en mer gynnsam effekt än behandling enbart med bioångning genom ökad rottillväxt och minskad andel missfärgade rötter. Vi ser särskilt bioångning som en metod som kan vara av stort intresse för att minska problem med rotsjukdomar i ekologisk tomatproduktion. Även om effekterna av behandlingen varierade mellan gårdar och försök var det överlag positiva effekter av bioångning.

Summary

Soil borne plant pathogens is a major problem in organic tomato production and is considered to be one of the most important reasons for the lower yields commonly observed in these production systems compared to conventional production. In this project, we have evaluated the possibilities to use biological control strategies to control root diseases of tomato: biofumigation with ground mustard seeds or augmentative biological control with a product based on Trichoderma spp. Effects of treatments in soil from different tomato greenhouse production sites was compared, and evaluated after bioassays with tomato plants. The most important disease in the soils included was found to be corky root rot, caused by Pyrenochaeta lycopersici type 2. Effects on shoot and root growth, root discoloration and fungal communities on roots were analysed. We found that the effect of biofumigation varied depending on the site, and generally had a beneficial effect on root and shoot growth, and that effects on root discoloration were most pronounced in soils with severe problems with corky root rot. A beneficial effect on root growth was not as clearly linked to disease reduction, but was seen also in one of the soils with very limited problems with pathogens. Soil treatment with Trichoderma spp. gave no significant effect on disease suppression or root growth. Combining Trichoderma treatments with biofumigation resulted in one case in a more beneficial effect by providing better root growth and reduced root discoloration. We regard biofumigation treatments as a promising method that can be of interest to reduce problems with root diseases in organic tomato production. Although effects of biofumigation varied among soils, the effects were in general beneficial for plant health and growth.

Introduktion

Jordburna växtsjukdomar orsakar stora problem i ekologisk tomatproduktion. En av de svåraste sjukdomarna är korkrot, som gör att växten får problem med vatten- och näringsupptag. Enligt en svensk inventering är korkrot ett problem i de flesta professionella odlingarna. Man bedömde att sjukdomen vanligen orsakar skördeminskningar på 30-40%, och i svåra fall upp till 75% (Forsberg *et al.*, 1999). Korkrot orsakas av svampen *Pyrenochaeta lycopersici*, som överlever i jorden i form av mikrosklerotier upp till 10-15 år. Arten beskrevs först på 1960-talet. Fram till dess gick den under namnet ”Gray sterile fungus”. Svampen växer långsamt i laboratoriemiljö och sporulerar sällan vilket försvårar såväl diagnos som systematisk karaktärisering. I början av 2000-talet föreslogs det att arten borde delas upp i två typer baserat på olikheter i genetik och tillväxt – typ 1 och typ 2 (Hieno *et al.* 2016; Infantino *et al.* 2015; Bayraktar och Oksal 2011). Biologin hos *P. lycopersici* är ännu till stora delar dåligt känd, vilket försvårar växtskyddsåtgärder för att begränsa patogenens förekomst och påföljande sjukdomsutbrott.

Trots att *P. lycopersici* är en svårbemästrad patogen är den en svag konkurrent gentemot många andra marklevande svampar och bakterier under sin saprotrofa fas. Det finns därför goda möjligheter att hämma sjukdomsutvecklingen genom biologisk bekämpning, antingen genom strategier där nyttoorganismer tillförs odlingen (tillsättande biologisk bekämpning) eller genom att stimulera markmikroorganismer (bevarande biologisk bekämpning) (Shishkoff 1990).

Flera typer av preparat för tillsättande biologisk bekämpning finns tillgängliga på den svenska marknaden, till exempel produkter baserade på svampar inom släktena *Trichoderma* eller *Gliocladium*, eller bakterier inom *Streptomyces* eller *Pseudomonas*. Varela *et al.* (2009) visade att ett flertal av dessa preparat har god förmåga att hämma korkrot på tomat. Introducerade organismer kan dock ha svårt att kolonisera jordar där de tillsätts, vilket ofta ger en stor variation i deras effektivitet mellan olika platser (Bae och Knudsen 2005). Strategier som testats för att få en mer pålitlig kolonisering av introducerade organismer är att via värmebehandling helt eller delvis sterilisera jord för att underlätta kolonisering av tillsatta nyttoorganismer, eller att tillsätta en näringskälla tillsammans med nyttoorganismen, som den kan utnyttja för att växa på (Marois och Locke 1985).

Bioångning, eller biofumigering, är en metod där växtmaterial av särskilda arter blandas ner i jorden. När det görs kommer toxiska ämnen ge en kortvarig steriliseringseffekt samtidigt som växtmaterialet kommer att utgöra en näringskälla för organismer som kan leva saprotrofiskt på det (Mazzola 2007; Morra och Kirkegaard 2002). Bioångning kan göras genom att odla en gröda på plats och sedan bruka ner den eller genom att odla växter på annan plats, föra dem till odlingen som ska behandlas och bruka ner dem där. Växtmaterialet kan vara färskt, torkat eller bestå av malda frön. Ett av de mer välstuderade systemen är att använda någon typ av korsblommiga växter (familjen Brassicaceae) som innehåller glukosinolater. När sådant växtmaterial brukas ner och cellerna går sönder kommer glukosinolaterna hydrolyseras till ämnen som hämmar ett brett spektrum av marklevande organismer (Morra och Kirkegaard 2002). Det finns många studier som visat bra effekter av bioångning som en strategi för att minska problem med jordburna växtsjukdomar, men åsikterna går isär om vilka mekanismer som är de mest betydelsefulla. Vissa menar att det är de toxiska ämnena (Morra och Kirkegaard 2002), medan andra menar att det är växtmaterialets förmåga att gynna konkurrerande nyttoorganismer (Mazzola *et al.* 2007). Kanske varierar det också beroende på vilken patogen som studeras. Ytterligare en effekt av bioångning är att såväl växten som patogenen kommer att påverkas genom att det tillsatta växtmaterialet påverkar markens

struktur och näringsstatus (Knopp och Mårtensson 2010). Strategier som bygger på att stimulera de markorganismer som finns i jorden kommer att variera i sina effekter mellan olika platser och jordtyper beroende på jordens fysiska, kemiska och biologiska egenskaper. När man använder bioångning kan det delvis ses som en typ av bevarande biologisk bekämpning, i de fall då effekten beror på att marklevande organismer stimuleras. Men det kan också vara andra typer av bekämpningsmekanismer som inte klassas som biologisk bekämpning, eller en kombination av flera mekanismer.

Ett problem som kan uppstå vid bioångning är att en patogen som initialt hämmas senare kan utnyttja växtmaterialet för att själv växa till (Friberg *et al.* 2009). Detta gäller för patogener med en bra förmåga att växa saprotrofiskt och konkurrera med andra marklevande organismer. Eftersom *P. lycopersici* är en svag konkurrent förväntas detta problem inte uppstå vid bioångning mot korkrot, men riskerna behöver undersökas innan bioångning kan rekommenderas som en lämplig strategi.

I det här projektet har vi frågat oss om bioångning och tillsatta mikroorganismer kan användas som en effektiv och pålitlig strategi för att mildra rotsjukdomar i ekologisk tomatproduktion under svenska förhållanden. Vi har haft ett särskilt intresse för korkrot, eftersom den anses vara den mest problematiska sjukdomen, men även undersökt bredare för att få en samlad bild av rötternas tillväxt och sjukdomsbild, och för att förstå hur svampar – både patogena och potentiella nyttosvampar – svarar på behandlingar av jorden. Våra huvudhypoteser var (1) att jordar från olika produktionsväxthus varierar i hur de reagerar vid bioångning eller tillsatser av biologiska bekämpningsorganismer (*Trichoderma spp.*), och (2) att en mer pålitlig sjukdomsbekämpning, med mindre variation mellan olika platser, kan uppnås genom att kombinera bioångning och tillsättande biologisk bekämpning.

Material och metoder

I projektet inriktade vi oss på bioångning med hjälp av frön av Calientesenap (Caliente mustard Brand 199, Tozer seeds Ltd, UK, innehållande sareptasenap (*Brassica juncea*), vitsenap (*Sinapis alba*) och oljerättika (*Raphanus sativus* var. *oleiformis*). Fröblandningen innehåller höga halter av glukosinolater och förväntas därmed ha goda förutsättningar att fungera vid bioångning. För tillsättande biologisk bekämpning valde vi ett preparat baserat på svampar inom släktet *Trichoderma* (*Trichoderma polysporum* och *Trichoderma harzianum* (Binab® TF WP, BINAB Bio-Innovation AB, Sweden), som tidigare visat sig kunna hämma korkrot på tomat (Varela *et al.* 2009).

Jordar

Jord samlades in från växthus i Sverige med professionell ekologisk tomatproduktion, och kontrollerade försök genomfördes med biotester i växthus vid SLU, Uppsala, för att möjliggöra en jämförelse mellan de olika jordarna. Insamlingen gjordes efter sista skörd av tomater för säsongen, och jorden lagrades sedan i +4°C fram till respektive försöks genomförande (max 2 månader). Bakgrundsinformation om jordar och gårdar samlades in genom intervjuer med odlare. En sammanställning presenteras i appendix 1. Jordarnas vatteninnehåll bestämdes genom att torka jordprover i 85 °C i tre dygn. Analyser av jordarnas näringsinnehåll genomfördes av Institutionen för mark och miljö (SLU).

Försök 1: Bioångning av jord, 5 gårdar

Det första försöket inriktade sig på användning av bioångning för att motverka rotsjukdomar. Fem olika jordar valdes ut från mellansvenska tomatproducenter (gård A-E), för att täcka in

jordar med olika egenskaper och med olika smittotryck från *P. lycopersici*. Varje kombination (gård och behandling) hade 5 replikat.

Behandling med bioångning gjordes genom inblandning av 2% malda frön av Calientesenap. Malning gjordes i en kvarn av märket Perten Laboratory Mill 3303 (malningsstorlek 3, Perten instruments, Hägersten, Sverige). Malda frön hölls torrt fram till behandling av jordarna (inom 2 veckor). I samband med inblandning av de malda fröna behandlades jordarna med 1dl vatten per liter jord, för att öka hydrolysning av glukosinolater. Kontrollbehandlingar behandlades enbart med vatten. Alla jordar inkuberades i plastlådor i 18°C under två veckors tid. Den första veckan täcktes de med lock, den andra veckan utan lock. Därefter analyserades de med avseende på effekter på rotsjukdomar, genom att tomater odlades i jordarna i ett biotest (beskrivet nedan).

Försök 2: Bioångning och tillsats av organismer i jord, 3 gårdar

I ett andra försök studerade vi kombinationen av bioångning och tillsatta biologiska bekämpningsorganismer i jord från tre utvalda odlingar från försök 1 (gård A, D och E). Varje kombination av behandling och gård hade 6 replikat.

Bioångningen gjordes på samma sätt som i försök 1. Dock modifierades tillsatsen av vatten eftersom vatteninnehållet i de olika jordarna vid denna insamling varierade stort och mängden tillsatt vatten justerades med tanke på det. Inget vatten tillsattes i jord A, 0,7 dl per liter i jord D och 1 dl per liter i jord E. Efter behandling med bioångning analyserades jordarna med avseende på effekter på rotsjukdomar, genom att tomater odlades i jordarna i ett biotest (beskrivet nedan). Preparatet Binab[®] tillsattes under tiden för biotestet genom vattning motsvarande 2×10^4 CFU per kruka, i enlighet med leverantörens rekommendationer. Inokulering med Binab[®] gjordes var 4e vecka.

Biotest för rotsjukdomar hos tomat

Tomatfrön (Arvento RZ, *Solanum lycopersicum*, Rijk Zwaan, Nederländerna) såddes i S-jord (Hasselfors, Örebro, Sverige) och fick växa under två veckor i 22–25 °C. Krukor (5 liter) fylldes med jord från de olika behandlingarna (försök 1 resp. försök 2) och en tvåveckorsplanta planterades per kruka. Biotestet genomfördes under 12 veckor i växthusmiljö med 70% luftfuktighet och en temperatur på 22°C dagtid och 18°C nattetid. Ljus tillfördes 16 timmar per dag under början av biotestperioderna (11 veckor), men stängdes av under den sista veckan för att undvika alltför höga temperaturer i växthuskammaren. Biotestplantorna vattnades varannan dag med näringslösning (2 ml per liter Wallco 51-10-43).

Vid biotestets slut mättes ovanjordisk biomassa (torrvikt) och rotvikt (våtvikt). Frukter plockades efterhand som de mognade samt vid biotestets slut. Alla frukter torkades och vägdes tillsammans. Rötterna tvättades rena från jord i kranvatten och vägdes innan de graderades för rotsjukdomar (procent missfärgad rotyta). Missfärgad rotyta bestämdes visuellt efter att alla rötter från rotsystemet klippts i bitar av 5 cm och delats i tre portioner för tre separata visuella uppskattningar av procent missfärgad rotyta, uppdelat i mildare brunfärgning och allvarligare mörkbrun missfärgning. Bedömningarna gjordes som blindtest, där avläsaren inte kände till vilken behandling de olika rötterna kom från.

Molekylära analyser

Rotbitar som bedömts för procent missfärgad yta tvättades i ultrarent vatten och förvarades sedan i -20 °C innan de frystorkades och maldes till ett fint pulver. DNA extraherades i tre tekniska replikat med 0,04g rot (torrvikt) i 1,5ml extraktionsbuffer (3% CTAB, 2mM EDTA,

150 mM tris-HCl, 2,6 M NaCl, pH = 8) i 65 °C under 1 timme och blandning genom vortex var 15e minut. Efter centrifugering extraherades supernatanten med lika volym kloroform, och DNA precipiterades med 1,5 volymenhet isopropanol i -20 °C över natt. Efter centrifugering tvättades pelletsen i 70% etanol och löstes upp i 50 µl ultrarent vatten.

PCR-analys användes för att detektera *P. lycopersici* typ 1 och typ 2 i rotproverna. För *P. lycopersici* typ 1 användes primerparen Plyc1-F (5'-GTAGGATTGCGTGCTTTGGT-3') och Plyc1-R (5'-AGTTTTCTGACGCTGATTGC-3'), och för typ 2 Plyc2-F (5'-CTGTAACATTGGGGGCTGGT-3') och Plyc2-R (5'-CGATGCCAGAACCAAGAGAT-3') for type 2 (Infantino och Pucci 2005). PCRamplifiering gjordes i 25µl-reaktioner med 0,6 U Taq-DNA-polymeras (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 2,5 µl 10 x PCR-buffer (10 Mm Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂), 0,25 µM av vardera primern, 0,2 mM av vardera dNTP och 20 ng DNA från DNA-extraktionerna.

RealtidsPCR användes för att kvantifiera mängden *P. lycopersici* typ 2, med samma primrar som tidigare. Antalet kopior av *P. lycopersici* typ 2 normaliserades mot mängden tomat-DNA, kvantifierat med växtspecifika primrar för aktingenen (Tucci *et al.* 2011; Schena *et al.* 2013). PCR-reaktionerna innehöll 5 µl templat (med 3ng DNA/µL), forward primer på 10 µM och reverse primer på 10 µM i Evagreen master mix (Biotium, CA, USA). PCRförhållandena var 30 sek i 95°C, 40 cykler med [10 s i 95°C, 30 s i 60°C]. En spädningsserie med PCR-produkter från isolat CBS 306.65 med 10¹ till 3 x 10⁸ kopior per reaktion användes för att generera en standardkurva för *P. lycopersici* typ 2, och en spädningsserie med PCRprodukter med aktinprimrar innehållande 3 x 10¹ to 3 x 10⁸ kopior per reaktion användes för att generera en standardkurva för aktingenen. Alla 3 extraktioner från varje prov analyserades i triplikat i 20 µl-reaktioner på en IQ5 thermocycler (Biorad, Carlsbad, CA, USA), följt av en dissocieringskurveanalys på 60-95°C.

Svampsamhället på tomatrötter karaktäriserades även genom amplikonsekvensering av ITS2-regionen av de gener som kodar för ribosomer, med primrar som primärt amplifierar DNA från svampar inom Basidiomycota och Ascomycota. PCR gjordes med primrarna fITS7 (Ihrmark *et al.* 2012) och ITS4 (White *et al.* 1990), med identifieringstaggar på 8bp, enligt beskrivning i Ihrmark *et al.* (2012) och Clemmensen *et al.* (2016). De tre tekniska replikaten av varje rotprov amplifierades med samma identifieringstag. PCR-amplifiering gjordes i en 2720 Thermal Cycler (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) i reaktioner på 25 µL med 20 ng DNA, 300 nM taggad ITS4 och 1000 nM fITS9, 0.025 U/µL polymeras (DreamTaq Green, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) i PCR buffer. Antalet PCR cykler (ca. 25) anpassades för varje prov för att undvika övermättnad och därmed skevheter i PCR-produkternas proportioner. De PCRförhållanden som användes var: 5 min i 94 °C och cykler med [30 s i 94 °C; 30 s i 55 °C; 30s i 72 °C] och 7 min i 72 °C.

PCR produkterna renades med AMPure kit (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) och koncentrationerna av de renade produkterna bestämdes med en NanoDrop 2000 spektrofotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). PCR produkter från alla prover blandades i ett samlingsprov med lika proportioner, baserat på innehåll och koncentration. Samlingsprovet renades ytterligare med GeneJet™ PCR-Purification Kit (Fermenta) och frystorkades. Sekvenseringsadaptorer tillsattes genom ligering och amplikonsekvensering gjordes med Pacific Biosciences sekvensering (Pacific Biosciences, Menlo park, CA, USA) av SciLifeLab (National Genomics Infrastructure, Uppsala, Sverige). Amplikonsekvenser analyserades genom att använda SCATA pipeline (<https://scata.mykopat.slu.se>). Sekvenser med en genomsnittlig kvalitetspoäng på 20 eller en enskild position under 10 exkluderades från fortsatt analys genom valet HQR extraktion. Klustringen av sekvenserna baserades på 38

bp av LSU-enheten, hela ITS2-regionen (122-245 bp) och 50-55 bp av 5.8S-enheten. Sekvenser jämfördes med BLAST, med minimumlängden satt till 90% av den längsta sekvensen. Homopolymerer kollapsades innan klustring (Miller *et al.* 2008). Sekvenser grupperades i kluster (OTUer) genom single-linkage-klustring med en maximal distans på 1,5%. Sekvenser som bara hittades en gång i hela datasetet uteslöts.

Den vanligaste sekvensen i varje OTU användes för taxonomisk bestämning (Lindahl *et al.* 2013) med hjälp av rdp classifier (Wang *et al.* 2007) och UNITE Fungal ITS trainset 07/04/2014. Bara bestämningar över 95% gränsvärde användes. OTUs som inte var från svampar (växtmaterial, ciliater och bryofyter) uteslöts innan fortsatt analys.

Statistiska analyser

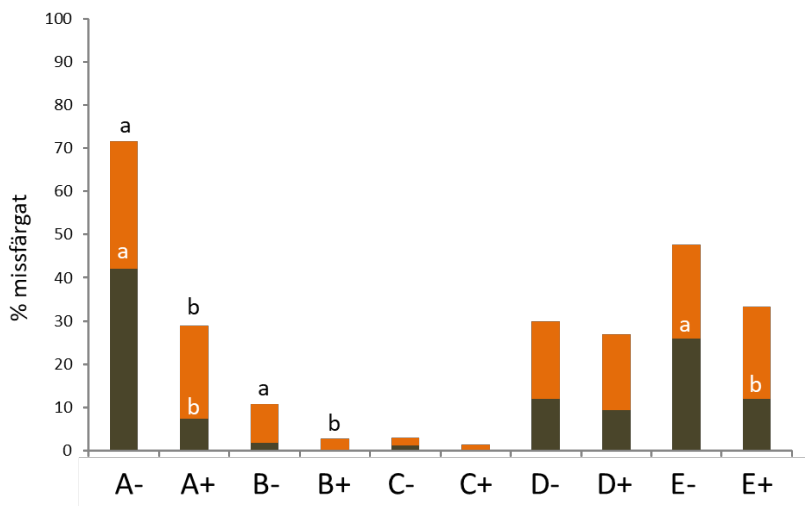
För att analysera effekten av inblandning av bioångning och tillsatta biologiska bekämpningsorganismer på förekomst av *P. lycopersici*, sjukdomsutveckling och tomatplantornas tillväxt användes ANOVA, med jämförelser inom varje jord (gård). Tukeys test ($P < 0.05$) användes för att kompensera för multipla jämförelser i försök 2. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) och funktionen envfit användes för att beskriva svampsamhällets struktur i relation till jord (gård) och behandling (vegan package; Oksanen *et al.* 2012). Alla statistiska analyser gjordes i R (R Core Team, 2016).

Resultat

Försök 1: Bioångning av jord, 5 gårdar

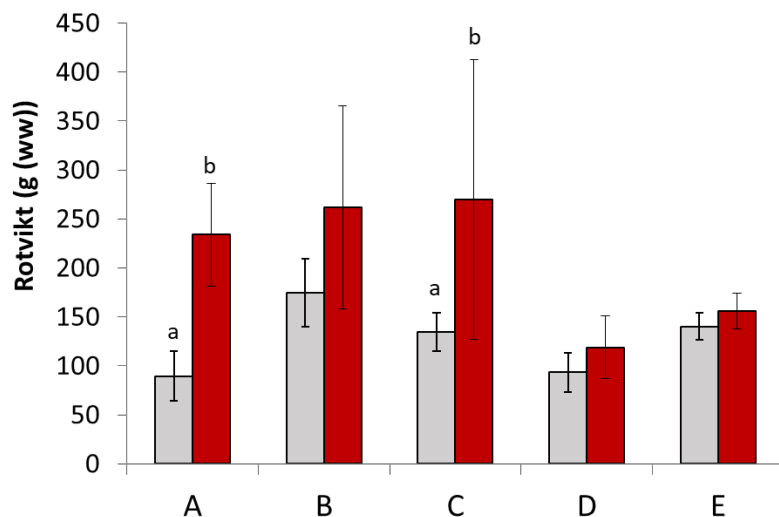
I det första försöket kunde vi se att bioångning genom inblandning av senapsmaterial i vissa fall mildrade problemen med missfärgade rötter. Den sammanlagda missfärgningen minskade efter senapsbehandling för två av jordarna (A och B). I de två jordar där problemen med missfärgade rötter var som störst (A och E) gav bioångning en signifikant reduktion av de kraftiga symptomen på tomatrötter (Fig. 1).

Mängden *P. lycopersici* typ 1 och typ 2 bestämdes med hjälp av RealtidsPCR, med primrar specifika för respektive typ av patogenen. Mängden som detekterades av typ 1 var mycket låg. Endast i jord D gav metoden ett positivt utslag, och nivåerna var alltför låga för att möjliggöra en trovärdig kvantifiering av *P. lycopersici* typ 1. Betydligt högre mängd av typ 2 detekterades i rötter från jord A, D och E, men inte i jord B eller C. Mängden *P. lycopersici* typ 2 per enhet rot korrelerade väl med andelen mörkt missfärgade rötter, men variationen inom behandlingarna var mycket stor, och inga signifikanta skillnader kunde ses.



Figur 1. Missfärgade rötter i de fem jordarna (A-E) med (+) och utan (-) bioängning. Bruna delen av stapeln anger kraftiga missfärgningar, orangea delen mildare missfärgningar. Olika bokstäver markerar statistiskt signifikanta skillnader i andel kraftig missfärgad rot resp. sammanlagd missfärgning ($P < 0,05$ Tukey's test; medelvärden, $n=5$).

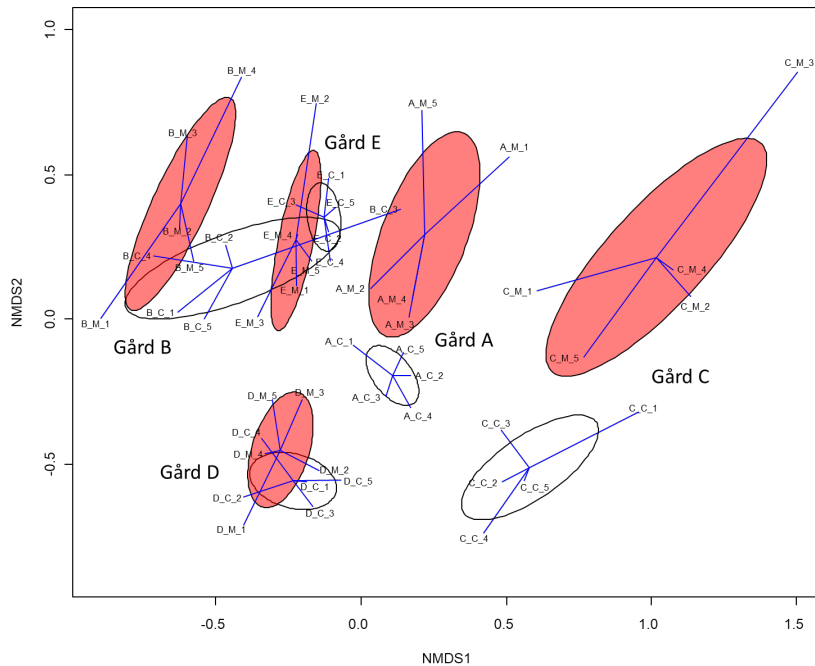
Rotvikten ökade generellt sett efter inblandning av senapsmjöl ($P = 0,00003$). Vid parvisa jämförelser var skillnaden signifikant för jord A (Fig. 2), alltså den jord som gav upphov till de svåraste missfärgningarna av rötterna, och där senapsbehandling hade en signifikant effekt både på andelen kraftigt missfärgade rötter och på den sammanlagda missfärgningen. Senapsbehandling gav dessutom en signifikant ökning av rotvikten i jord C, som var en av de jordar där mycket begränsade missfärgningar av tomatrötter observerades, och där bioängningen inte gav någon signifikant skillnad i andelen missfärgade rötter.



Figur 2. Rotvikten (våtvikter) i de fem jordarna (A-E) utan (grå) och med (röd) bioängning. Olika bokstäver markerar statistiskt signifikanta skillnader (medelvärden \pm SD, $n=5$).

Även skottvikten ökade efter bioångning ($P=0,000005$), med en signifikant effekt för jord A ($P=0,005$) och jord C ($P=0,003$).

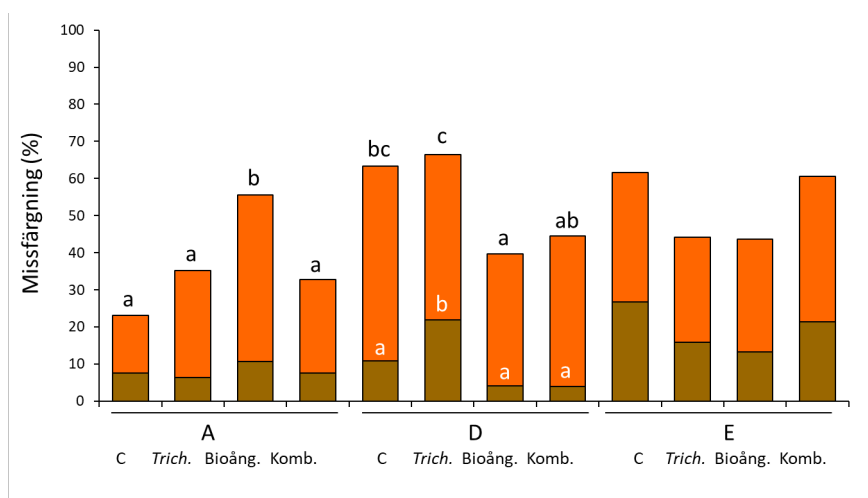
Svampsamhällen på tomatrötter varierade mellan de olika jordarna. I två av jordarna (A och C) resulterade bioångning i en signifikant förändring av svampsamhällets struktur, medan svampssamhällena i rötter från övriga jordar inte förändrades signifikant efter bioångning (Fig. 3).



Figur 3: Svampsamhällen i tomatrötter. NMDS av data från ITSAMPLIKON för respektive rotprov (gård (A-E), behandling (C (kontroll)/M (bioångning), replikatnummer). Prover från samma gård och behandling är sammanbundna med streck som sammanstrålar i barycentrum för respektive gård-behandlingskombination. Variationen visas med cirklar med 95% konfidensintervall (röda för bioångning och vita för obehandlade kontroller).

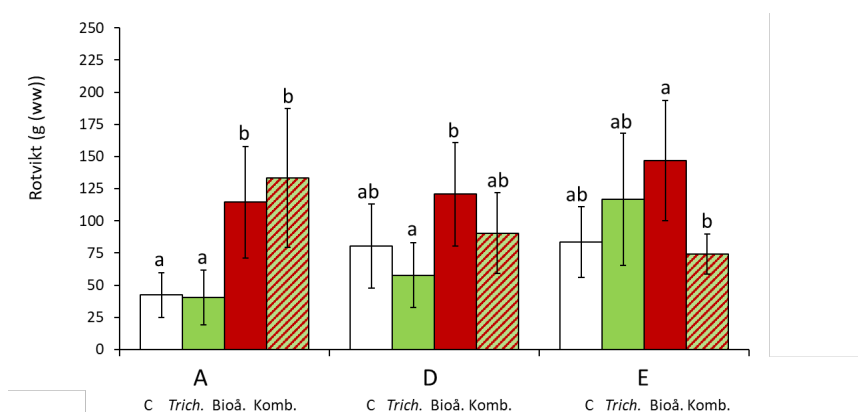
Försök 2: Bioångning och tillsats av organismer i jord, 3 gårdar

I försök 2 gav bioångning en ökning i andelen missfärgade rötter i ett fall (jord A), minskad missfärgning i ett fall (D) och ingen signifikant skillnad i ett fall (E). Tillsats av *Trichoderma*-preparat ökade de kraftigt missfärgade rötterna i jord D när det gjordes som enskild behandling, men inte då det kombinerades med bioångning (Fig. 4).



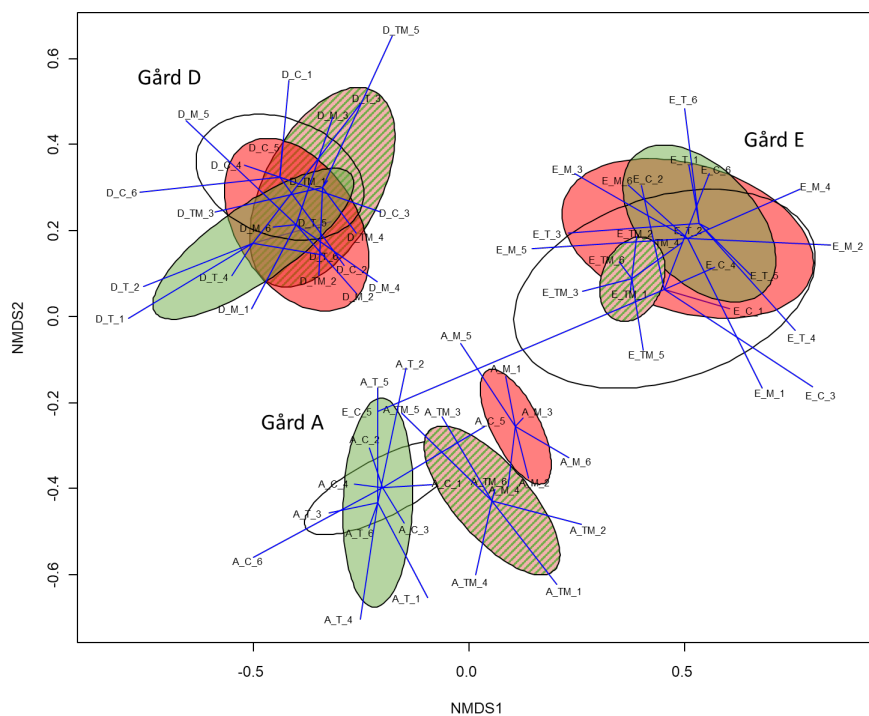
Figur 4. Missfärgade rötter i tre jordar (A, D och E), i kontrollbehandling (C), med tillsatt *Trichoderma*-preparat (Trich.), efter biofäring (Biof.) och i kombinationsbehandling med *Trichoderma*-preparat och biofäring (Komb.). Bruna delen av stapeln anger kraftiga missfärgningar, orangea delen mildare missfärgningar. Olika bokstäver markerar statistiskt signifikanta skillnader i andel kraftig missfärgad rot resp. sammanlagd missfärgning (medelvärden, $n=6$).

Effekten av behandlingarna på rotvikten skiljde sig åt mellan de olika jordarna. Både biofäring som separat behandling och i kombination med *Trichoderma*-preparat gav en ökad rotvikt i jord A, medan effekterna inte var signifikanta jämfört med kontrollbehandlingen i de båda andra jordarna



Figur 5. Rotvikten (våtvikter) i tre jordar (A, D och E), i kontrollbehandling (C, vit), med tillsatt *Trichoderma*-preparat (Trich., grön), efter biofäring (Biof., röd) och i kombinationsbehandling med *Trichoderma*-preparat och biofäring (Komb., randig). Olika bokstäver markerar statistiskt signifikanta skillnader (medelvärden \pm SD, $n=6$).

De två behandlingarna med biofäring (biofäring separat och i kombination med *Trichoderma*-preparat) hade en signifikant effekt på svampsamhället i jord A, men inte i de andra två jordarna. Behandling med *Trichoderma* gav ingen signifikant skillnad i svampsamhället på tomatrötterna i någon av jordarna (Fig. 6).



Figur 6: Svampsamhällen i tomatrötter. NMDS av data från ITS-amplikon för respektive rotprov: jord (A, D, E), behandling (C (kontroll), T (tillsatt *Trichoderma*-preparat, M (bioängning) och TM (kombination av *Trichoderma*-preparat och bioängning), replikatnummer (1-6). Prover från samma gård och behandling är sammanbundna med streck som sammanstrålar i barycentrum för respektive gård-behandlingskombination. Variationen visas med cirklar med 95% konfidensintervall (vita för obehandlade kontroller, gröna för *Trichoderma*-behandlade, röda för bioängning och streckade för prover med kombinationsbehandling med *Trichoderma*-preparat och bioängning).

Diskussion

Två typer av patogenen som orsakar korkrot

Eftersom korkrot är den sjukdom som anses vara det svåraste problemet i svensk tomatproduktion har våra studier haft ett särskilt fokus på patogenen *P. lycopersici*. Information kring patogenens förekomst och biologi, liksom betydelsen av de två typerna av *P. lycopersici*, är fortfarande mycket bristfällig. Kartläggningar som genomförts i Japan, Italien och Turkiet tyder på att typ 2 är vanligast förekommande i sjukdomsdrabbade odlingar (Hieno *et al.* 2016; Infantino *et al.* 2015; Infantino *et al.* 2003; Bayraktar och Oksal 2011). I den ursprungliga beskrivningen av typerna beskrevs typ 1 som den mer aggressiva typen, men senare undersökningar har visat på en så stor inomtypsvariation att denna slutsats nu ifrågasätts (Infantino *et al.* 2015). Vi använde oss av molekylära metoder (PCR) för att bestämma vilken typ och mängd av korkrotpatogenen *P. lycopersici* som fanns i rötterna från våra försök, baserat på metoder som utvecklats i Italien. Vi detekterade bara låga mängder av typ 1, men betydligt högre nivåer av typ 2, i ett mönster som väl speglade problemen med mörka missfärgningar på rötterna. Det är alltså sannolikt *P. lycopersici* typ 2 som orsakade de största problemen i de jordar vi undersökte. Patogenen kunde inte detekteras i rötter från jord B eller C, trots att de hade vissa missfärgningar. Det är därför troligt att dessa missfärgningar inte är resultatet av korkrot, utan andra patogener eller faktorer som kan ge missfärgade rötter.

Effekter av bioångning och tillsättande biologisk bekämpning

Bioångning hade generellt sett en positiv effekt på tomatplantornas rot- och skotttillväxt. I det första försöket kunde vi också se en tydlig positiv effekt på sjukdomshämning: I de jordar där rötterna hade svårare angrepp blev det en klar förbättring, medan vi inte kunde se någon skillnad i jordar med begränsade angrepp. Detta var dock inte lika tydligt i det andra försöket, där vi i ett fall fick en högre andel missfärgade rötter efter bioångning. Eftersom rotvikten i detta fall ökade skulle det kunna vara ett resultat av att de svårast angripna rötterna dog i det obehandlade ledet (kontrollbehandlingen), men överlevde längre i behandlingen med bioångning. Effekten skiljde sig inte bara åt mellan gårdarna, utan också mellan de två försöken som genomfördes, där det första försöket gav större effekter generellt.

Tillsättande biologisk bekämpning studerades i det andra försöket, genom behandling med preparat av *Trichoderma spp.* Behandlingen gav ingen minskning av missfärgningar eller ökning av rotvikten. Tvärt emot våra förväntningar gav behandlingen en högre andel mörkt missfärgade rötter i ett fall (jord D). Missfärgning kan, som tidigare diskuterats, uppstå av olika anledningar, och det är inte nödvändigtvis skador som leder till försämrad rotfunktion. I det här fallet (jord D) kan vi dock se att rotvikten var den lägsta av alla behandlingar, signifikant lägre än i det bioångade ledet. Därmed tycks det som att missfärgningen efter behandlingen i det här fallet har en koppling till försämrad rotfunktion. Det här resultatet skiljer sig från tidigare studier med samma produkt med *Trichoderma*, där såväl patogentillväxt *in vitro* som skada *in vivo* hämmades då preparatet användes (Varela *et al.* 2009). Ett vanligt förekommande problem vid tillsättande biologisk bekämpning är att den tillsatta organismen inte har förmåga att kolonisera jorden den tillsätts i. Det skulle kunna ha inträffat i de försök vi genomförde. När rötternas svampsamhällen analyserades (Fig. 6) kunde vi inte se någon skillnad mellan de led som behandlades med *Trichoderma* jämfört med de obehandlade leden. Detta är en indikation på att koloniseringen inte varit omfattande. En bristande kolonisering är dock inte i sig en förklaring till den försämrade rottillväxten eller missfärgningen av rötter.

Genom att kombinera bioångning och tillsättande biologisk bekämpning hoppades vi kunna få en mer effektiv och säkrare metod att bekämpa korkrot. En sådan effekt kunde vi generellt sett inte se i våra resultat, även om det i ett fall (jord A) blev en positiv effekt av att kombinera behandlingarna eftersom rottillväxten blev lika gynnad som i behandlingen med bioångning (Fig. 5) samtidigt som andelen missfärgade rötter inte ökade (Fig. 4).

Svampsamhällen speglar behandlingseffekterna

Karaktärisering av svampsamhällen gjordes på rötter från tomatplantor i båda försöken. I båda fallen kunde vi se att rötter odlade i olika jordar (från olika gårdar) i nästan samtliga fall separeras i analysen. Det är ett förväntat resultat, eftersom det är väl känt att såväl jordart som brukningsmetoder har stor påverkan på vilka svampar som växer och i vilka proportioner de förekommer. Förutom skillnaden mellan olika jordar (gårdar) syns i första försöket att svampsamhället förändrades signifikant av bioångning för gård A och C, alltså de gårdar där bioångning gav en signifikant ökad rotvikt i biotestet. För gård A skulle förändringen kunna bero på en mindre andel missfärgade rötter efter bioångning. För gård C kan vi däremot inte göra den kopplingen eftersom biotestplantorna som odlades i den jorden uppvisade mycket liten missfärgning även i de obehandlade leden. Bioångning har föreslagits ge en positiv effekt på växters rottillväxt som inte bara har med hämning av sjukdomar att göra, genom att stimulera gynnsamma markmikroorganismer (Zhang *et al.* 2020). Även om vi i det här fallet

inte kan säga exakt vad som givit den förbättrade rottillväxten är möjligt att det är en sådan effekt som uppkommit i detta fall.

Slutsats

De rotproblem som drabbade tomatplantorna i våra biotest var troligen till största delen av korkrot, orsakat av *P. lycopersici* typ 2. I våra försök såg vi att effekten av bioångning varierade mellan jordar från olika gårdar. Överlag hade behandlingen en positiv effekt på rot- och skotttillväxt. Sjukdomshämningen var tydligast i jordar med svåra problem med korkrotsjuka. En gynnsam effekt på rottillväxten var inte lika tydligt kopplad till sjukdomsproblematik, utan syntes även i en jord med mycket begränsade sjukdomsproblem. Behandling av jorden med *Trichoderma spp.* gav ingen gynnsam effekt på sjukdomshämning eller rottillväxt. En kombination av *Trichoderma spp.* och bioångning minskade inte på variationen mellan behandlingar, men gav i ett fall en mer gynnsam effekt än behandling enbart med bioångning genom att ge en ökad rottillväxt och minskad andel missfärgade rötter.

Vi ser särskilt bioångning som en metod som kan vara av stort intresse för att minska problem med rotsjukdomar i ekologisk tomatproduktion. Även om effekterna av behandlingen varierade mellan gårdar och försök var det överlag positiva effekter av bioångning.

Tack

Vi vill rikta ett stort tack till de odlare som bidragit med information och idéer under projektets gång, särskilt till de odlare som låtit oss använda jord från odlingar. Tack också till Elisabeth Ögren, Jordbruksverket, som delat med sig av erfarenhet och kunskap. Projektet har förutom stödet från SLU EkoForsk fått finansiellt stöd från Flory Gates stiftelse Fred med Jorden och från SLUs kompetenscentrum för biologisk bekämpning.

Referenser

- Bae, Y.S., och Guy R. Knudsen. 2005. 'Soil Microbial Biomass Influence on Growth and Biocontrol Efficacy of *Trichoderma harzianum*'. *Biological Control* 32 (2): 236–42. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.10.001>.
- Bayraktar, Harun, och Erçin Oksal. 2011. 'Molecular, Physiological and Pathogenic Variability of *Pyrenochaeta lycopersici* Associated with Corky Rot Disease of Tomato Plants in Turkey'. *Phytoparasitica* 39 (2): 165–74. <https://doi.org/10.1007/s12600-011-0150-z>.
- Forsberg, A-S., Sahlström, K. & Ögren, E. 1999. Rotröteproblem i ekologisk odling. Jordbruksinformation 12, Jordbruksverket, Jönköping, Sweden.
- Friberg, Hanna, Véronique Edel-Hermann, Céline Faivre, Nadine Gautheron, Léon Fayolle, Vincent Faloya, Françoise Montfort, och Christian Steinberg. 2009. 'Cause and Duration of Mustard Incorporation Effects on Soil-Borne Plant Pathogenic Fungi'. *Soil Biology and Biochemistry* 41 (10): 2075–84. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.07.017>.
- Hieno, Ayaka, Hushna Ara Naznin, Haruhisa Suga, Yoshiharu Y. Yamamoto, och Mitsuro Hyakumachi. 2016. 'Specific Detection of Type 1 and Type 2 Isolates of *Pyrenochaeta lycopersici* by Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction'. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science* 66 (4): 353–58. <https://doi.org/10.1080/09064710.2015.1120341>.

- Infantino, A., N. Pucci, M. Aragona, S. de Felice, och D. Rau. 2015. 'Genetic Structure of Italian Populations of *Pyrenochaeta lycopersici*, the Causal Agent of Corky Root Rot of Tomato'. *Plant Pathology* 64 (4): 941–50. <https://doi.org/10.1111/ppa.12326>.
- Infantino, Alessandro, Maria Aragona, Angela Brunetti, Ernesto Lahoz, Anna Oliva, och Angelo Porta-Puglia. 2003. 'Molecular and Physiological Characterization of Italian Isolates of *Pyrenochaeta lycopersici*'. *Mycological Research* 107 (6): 707–16. <https://doi.org/10.1017/S0953756203007962>.
- Infantino, Alessandro, och Nicoletta Pucci. 2005. 'A PCR-Based Assay for the Detection and Identification of *Pyrenochaeta lycopersici*'. *European Journal of Plant Pathology* 112 (4): 337–47. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-6605-7>.
- Knopp, J., och Anna M. Mårtensson. 2010. 'Nitrogen Fertilisation and Substrate PH Effects on Corky Root Disease (*Pyrenochaeta lycopersici*) in Greenhouse Tomatoes'. *Archives of Agronomy and Soil Science* 56 (6): 633–48. <https://doi.org/10.1080/03650340903191655>.
- Lindahl, Björn D., R. Henrik Nilsson, Leho Tedersoo, Kessy Abarenkov, Tor Carlsen, Rasmus Kjølner, Urmas Kõljalg, *et al.* 2013. 'Fungal Community Analysis by High-Throughput Sequencing of Amplified Markers - a User's Guide'. *New Phytologist* 199 (1): 288–99. <https://doi.org/10.1111/nph.12243>.
- Marois, J. J. 1985. 'Population Dynamics of *Trichoderma viride* in Steamed Plant Growth Medium'. *Phytopathology* 75 (1): 115. <https://doi.org/10.1094/Phyto-75-115>.
- Mazzola, Mark. 2007. 'Manipulation of Rhizosphere Bacterial Communities to Induce Suppressive Soils'. *Journal of Nematology* 39 (3): 213–20.
- Mazzola, Mark, Jack Brown, Antonio D. Izzo, och Michael F. Cohen. 2007. 'Mechanism of Action and Efficacy of Seed Meal-Induced Pathogen Suppression Differ in a Brassicaceae Species and Time-Dependent Manner'. *Phytopathology* 97 (4): 454–60. <https://doi.org/10.1094/PHTO-97-4-0454>.
- Morra, M.J, och J.A Kirkegaard. 2002. 'Isothiocyanate Release from Soil-Incorporated Brassica Tissues'. *Soil Biology and Biochemistry* 34 (11): 1683–90. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00153-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00153-0).
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R *et al.* vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-5. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- R Core Team, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016. ISBN 3-900051-07-0, URL <https://www.R-project.org/>
- Schena, L., M.G. Li Destri Nicosia, S.M. Sanzani, R. Faedda, A. Ippolito, och S.O. Cacciola. 2013. 'Development of quantitative PCR detection methods for phytopathogenic fungi and oomycetes'. *Journal of Plant Pathology* 95 (1). <https://doi.org/10.4454/JPP.V95I1.016>.
- Shishkoff, Nina. 1990. 'Survival of *Pyrenochaeta lycopersici* and the Influence of Temperature and Cultivar Resistance on the Development of Corky Root of Tomato'. *Plant Disease* 74 (11): 889. <https://doi.org/10.1094/PD-74-0889>.
- Tucci, Marina, Michelina Ruocco, Luigi De Masi, Monica De Palma, och Matteo Lorito. 2011. 'The Beneficial Effect of *Trichoderma spp.* on Tomato Is Modulated by the Plant Genotype: Plant Genotype-*Trichoderma* Interaction'. *Molecular Plant Pathology* 12 (4): 341–54. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00674.x>.
- Varela, Ana Rita, Birgitta Rämert, och Anna Mårtensson. 2009. 'Potential Use of Biocontrol Agents for Control of *Pyrenochaeta lycopersici* in Tomato Crops'. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Plant Soil Science* 59 (4): 379–84. <https://doi.org/10.1080/09064710802263218>.

- Wang, Q., G. M. Garrity, J. M. Tiedje, och J. R. Cole. 2007. 'Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of RRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy'. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (16): 5261–67. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>.
- Zhang, Daqi, Dongdong Yan, Hongyan Cheng, Wensheng Fang, Bin Huang, Xianli Wang, Xiaoning Wang, *et al.* 2020. 'Effects of Multi-Year Biofumigation on Soil Bacterial and Fungal Communities and Strawberry Yield'. *Environmental Pollution* 256 (January): 113415. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113415>.

Projektpresentationer och publikationer

- Samils N, Mårtensson A, Rämert B, Ögren E, Friberg H (2014) Disease control in organic tomato production – combined biological control with microorganisms and biofumigation. IOBC-wprs XIII meeting of WG Biological control of fungal and bacterial plant pathogens. Uppsala 2014.
- Samils N, Mårtensson A, Rämert B, Ögren E, Friberg H (2014) Disease control in organic tomato production – combined biological control with microorganisms and biofumigation. ”Plant protection against pests and weeds at SLU” 2-3 October 2014.
- Samils N, Mårtensson A, Rämert B, Ögren E, Friberg H. Strategi för säker ekologisk tomatodling – kombinerad sjukdomskontroll genom gödsling, biofumigering och biologisk bekämpning. Muntlig presentation på temadag om ekologisk växthusodling: ”Hur kan odling i markjorden bli hållbar på lång sikt?” Uppsala, Februari 2015.
- Friberg, H. Mårtensson, M. Rämert, B. Ögren, E. Sjukdomsbekämpning i ekologisk tomatproduktion – kombinerad biologisk bekämpning med mikroorganismer och sanerande växter. Växtskyddskonferensen, Uppsala, november 2015. Oral presentation.
- Friberg, H., Berner, C., Homman, K., Mårtensson, A. Biological control of root diseases in tomato. Växtskyddskonferensen, Uppsala, november 2018. Oral presentation.

- Moritz, Stina, 2017. Rotsjukdomar på tomat : växtskyddsåtgärder för bekämpning av *Pyrenochaeta lycopersici* och *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* på ekologisk tomat. Grundnivå, G2E. Uppsala: SLU, Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi. <https://stud.epsilon.slu.se/11056/>

- Mårtensson, A. Friberg, H. 2017. Impact of organic N on corky root in organically cultivated greenhouse tomatoes. *Acta Hort.* 1164, 327-332. DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1164.41

Appendix 1: Beskrivning av gårdar

Gård	A	B	C	D	E
Produktionsstart	1979	2010	2011	1997	1989
Kemiska analyser	pH: 6.04 C: 5.36 % N: 0.37 % P: 2.7 mg/g Mullhalt: 12.4 %	pH: 5.96 C: 6.00 % N: 0.45 % P: 2.2 mg/g Mullhalt: 15.1 %	pH: 6.75 C: 4.45 % N: 0.27 % P: 0.5 mg/g Mullhalt: 12.3 %	pH: 6.10 C: 10.01 % N: 0.65 % P: 1.4 mg/g Mullhalt: 37.8 %	pH: 5.48 C: 10.29 % N: 0.86 % P: 4.1 mg/g Mullhalt: 31.1 %
Jordart	Mullrik mo	Mycket mullrik sand	Mycket mullrik sand	Lerig mulljord	Lerig mulljord
Gödsling	Hästgödsel och slaktbiprodukter. Jordanalyser fram till 2015. Nu uppskattad gödselgiva.	Stallgödsel, blodmjöl, kalium, magnesium och kväve, slaktbiprodukter. Årliga jordanalyser. Tillsätter 30% mer göding än behovet. Tre gödselgivor per år.	Stallgödsel veckovis i samband med bevattning.	Benmjöl, blodmjöl, kalium och magnesium. Efter att plantorna rotat sig.	Hästgödsel innan plantering. Blodmjöl, kalium, magnesium vid behov. Använder inte jordanalyser.
Problem	Har märkt av minskade skördar över tid. Sedan man börjat med ympade plantor har problemen mildrats.	Inga märkbara problem med rotrötter, men med avsnörda rothalsar på yngre plantor.	Inga märkbara problem med rotrötter.	Har märkt av minskade skördar över tid.	Märkte tidigt av problem med rotsjukdomar. Sedan man börjat med ympade plantor har problemen mildrats och skördarna ökat.

Skörderest- hantering	Skörderester komposteras och återanvänds inte i produktionen.	Skörderester komposteras och återanvänds inte i produktionen.	Skörderester komposteras och återanvänds inte i produktionen.	Skörderester komposteras och återanvänds inte i produktionen.	Skörderester slängs eller bränns och återanvänds inte i produktionen.
Uppvärmning	Ja	Ja	Nej	Ja	Ja
Ympade plantor	Ja	Ja	Nej	Ja	Ja
