

Bekæmpelse af sygdomme i frøbede af Nordmannsgran ved hjælp af biologiske og kulturtekniske metoder i skovplanteskoler

Inge Knudsen, John Hockenhull og Dan Funck Jensen
Institut for Plantebiologi, KVL

Kirsten Thomsen
Statsskovenes Planteavlsstation, Skov- og Naturstyrelsen

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Indhold

INDHOLD	3
FORORD	5
SAMMENFATNING	7
SUMMARY	9
1 INTRODUKTION	11
1.1 BAGGRUND	11
1.2 HYPOTESER	13
1.3 FORMÅL	13
1.3.1 Specifikke delmål:	13
2 UNDERSØGELSER AF PATOGENER I FORSØGSAREALET OG PÅ FRØ	15
2.1 SVAMPE I FORSØGSAREALET	15
2.1.1 Materialer og metoder	15
2.1.2 Resultater	16
2.2 SVAMPE PÅ FRØ	17
2.2.1 Materialer og metoder	17
2.2.2 Resultater	18
2.3 KONKLUSION	19
3 FRØETS SPIREEVNE VED FORSKELLIGE FORBEHANDLINGS-LÆNGDER OG BIOLOGISK BEKÆMPELSE AF FRØBÅRENT SMITTE	21
3.1 MATERIALER OG METODER	21
3.2 RESULTATER	22
3.3 KONKLUSION	25
4 SMITTEFORSØG MED PYTHIUM ULTIMUM VAR ULTIMUM	26
4.1 METODE	26
4.2 RESULTAT	26
4.3 KONKLUSION	27
5 ANTAGONISTKOLONISERING AF FRØ	28
5.1. UNDERSØGELSE AF DÆKNINGSGRAD AF CLONOSTACHYS ROSEA IK726 VED TRE FORSKELLIGE TYPER FORMULERINGER	28
5.1.1 Materialer og metoder	28
5.1.2 Resultater	28
5.2 VÆKST AF C.ROSEA PÅ FRØ UNDERSØGT VED ANVENDELSE AF GFP-MÆRKET ISOLAT	29
5.2.1 Metode	29
5.2.2 Resultat	29
5.2.3 Konklusion	29

6	ANTAGONISTFORSØG I KONTROLLERET MILJØ MED <i>PYTHIUM ULTIMUM</i> SMITTE	31
6.1	ANTAGONISTFORSØG 2002/2003	31
	6.1.1 Materialer og metoder	31
	6.1.2 Resultat	33
6.2	PARALLELFORSØG TIL MARKFORSØG 2003 I POTTER INOKULERET MED <i>PYTHIUM ULTIMUM</i> VAR <i>ULTIMUM</i>	34
	6.2.1 Materiale og metoder	34
	6.2.2 Resultater	34
6.3	DISKUSSION OG KONKLUSION	35
7	BEKÆMPELSE AF SYGDOMME PÅ <i>ABIES NORDMANNIANA</i> FRØPLANTER VED HJÆLP AF ANTAGONISTISKE MIKROORGANISMER UNDER MARKFORHOLD	37
7.1	MATERIALE OG METODER	37
	7.1.1 Forsøgsdesign	38
	7.1.2 Opgørelse i marken	39
	7.1.3 Statistiske analyser	40
7.2	RESULTATER	40
7.3	DISKUSSION OG KONKLUSION	41
8	BEKÆMPELSE AF SYGDOMME PÅ <i>ABIES NORDMANNIANA</i> FRØPLANTER VED HJÆLP AF ÆNDREDE DYRKNINGSFORHOLD I MARKEN	46
8.1	MATERIALER OG METODER	46
8.2	RESULTATER	46
8.3	DISKUSSION OG KONKLUSION	47
9	SAMLET DISKUSSION OG KONKLUSION	48
10	PERSPEKTIVERING	51
10.1	FRØETS RESPONS PÅ ANTAGONISTBEHANDLING	51
10.2	IPM STRATEGI	51
10.3	BEHANDLING MED ANTAGONISTER I ANDRE DYRKNINGSSYSTEMER	52
11	LITTERATUR	53

Forord

Denne rapport er baseret på resultater opnået i projektet "Bekæmpelse af sygdomme i frøbede af Nordmannsgran ved hjælp af biologiske og kulturtekniske metoder i skovplanteskoler". Projektet er finansieret af Miljøstyrelsens Pesticidforskningsprogram (Journal no M 7041-0475) ved tilsagn pr. 5. april 2002. Projektet er afsluttet pr. 1. april 2005. To institutioner har samarbejdet i projektet: Plantepatologisk Sektion, Institut for Plantebiologi, Den kgl. Veterinære- og Landbohøjskole (KVL), Frederiksberg og Statsskovenes Planteavlsstation, Skov- og Naturstyrelsen (SSP), Humlebæk. Fra KVL deltog som projektleder og daglig leder på projektet Inge M B Knudsen, med sparringspartnerne Dan Funck Jensen og John Hockenhull. Karin Olesen har gennem hele forsøgsperioden deltaget i de praktiske forsøg, der foregik på KVL. På Statsskovenes Planteavlsstation var Peter Oschner og Mette Damm med til forarbejdet vedrørende ansøgningen og tilrettelæggelse af markforsøg. De måtte desværre begge træde tilbage efter få måneders arbejde med projektet. De skal begge takkes for deres indsats for at få projektet løbet i gang. Kirsten Thomsen overtog Peter Oschners arbejde. I laboratoriet på SSP har Lene Tjott Müller og Sigrit Diklev hjulpet med det praktiske arbejde.

Markforsøgene i Fosdal Planteskole har udgjort en væsentlig del af projektet. En stor tak skal rettes til Kent Nielsen, der har været særdeles åben og samarbejdsvillig omkring at finde forsøgsarealer og stille mandskab til rådighed til pasning af forsøget. Det har også været en glæde at kunne få hjælp til de arbejdskrævende opgørelser i marken. Her skal der rettes en tak til det altid optimistiske "lugehold": Charlotte Enevoldsen, Helga Pedersen og Laila Helligkilde. Med fra SSP, Humlebæk var Hanne Jørgensen, som et uvurderligt forbindelsesled mellem vores laboratoriedel og markforsøgsdelen. En stor tak til Hanne, der altid drog af sted til Jylland med kort varsel uden at kny og med stor seriøsitet varetog opgaven med såning og opgørelser. Også tak til Jørgen Hjorth for fotodokumentation ved markforsøget 2003.

I løbet af forsøgsperioden har vi haft glæde af at diskutere vores projekt med: Jørgen Kock og Iben Thomsen, KVL samt Zdenka Procházková, Research Station Uherske Hradiste, Kunovice, Czech Republic, der alle har store erfaringer med skovplanters sygdomme. Også tak til Kaare Møller, DJF, Flakkeberg, der har arbejdet parallelt med skovfrøtest i forbindelse med et andet Pesticidforsknings-projekt.

I øvrigt rettet en tak til de skiftende følgegrupper i MST regi, hvor især Sabine Ravnskov og John Larsen, DJF takkes for værdifulde diskussioner. Her skal også rettes en tak til Jørn Kirkegård fra MST.

Sammenfatning

Rodbrand, hvor jordbårne svampe angriber både fremspirende og helt unge frøplanter på frøbedet er et stort problem under planteskoleproduktion af nåletræer. Frøbårne svampe som *Fusarium* spp., der kan opformeres under stratificeringen af frøene, kan også bidrage til problemet.

Svampesygdommene bekæmpes med hyppig behandling med fungicider og jorddesinfektionsmidlet Basamid. Med henblik på en mere miljøvenlig produktion vil det være ønskeligt at finde alternativer til specielt den meget intensive jorddesinficering. Nordmannsgran (*Abies nordmanniana*) planter produceres i stort omfang til juletræsproduktion, og her er frøbedene første led i produktionen, hvor pesticid belastningen er kritisk høj.

Formålene med dette projekt var at: (i) identificere de vigtigste patogener i nordmannsgran frøbede, (ii) afprøve effekten af forskellige biologiske (antagonistiske) frøbehandlinger på fremspiring og overlevelse i frøbedet, og (iii) optimere biologiske bekæmpelsesmidler i kombination med eksisterende frøteknologi. Forsøgene inkluderede fire forskellige antagonister: tre kommercielle produkter: 1) TRI 003 og 2) Supresivit baseret på svampen *Trichoderma harzianum* og 3) FZB Biotechnik GmbH9, baseret på bakterien *Bacillus subtilis*. Endelig indgik 4) det nært kommercielle produkt af svampen *Clonostachys rosea* isolat IK726, som blev valgt, fordi det har vist en god effekt i andre kulturer og fremmer fremspiring, når det coates på frø under 'våde' frøbehandlinger f.eks. under priming af gulerodsfrø.

Markforsøgene blev udført på Skov- og Naturstyrelsens planteskole i Fosdal, som i 2002 var ved at indføre pesticidfri produktion.

I jordprøver fra planteskolen blev det påvist vha. baiting og efterfølgende patogenitetstests af isolater, at den altovervejende årsag til rodbrand skyldtes jordbårne *Pythium* arter især *Pythium ultimum*. *Fusarium* arter især *Fusarium oxysporum* og *Fusarium redolens* forårsagede topvisning. Af frøbårne svampe blev det fundet at *Fusarium oxysporum* var den hyppigste skadevolder, men også at svampen *Papulaspora immersa*, der ikke tidligere er fundet patogen, i et neutralt væksts substrat (vermiculit) kan forårsage skader på frøplanterne. Frøpartier af varierende vitalitet og frøhvile blev stratificeret i hhv. tre og seks uger og coatet med *C. rosea* IK 726 før eller efter stratificeringen.

Forbehandlingen (stratificeringen) foregik ved 3°C og med et vandindhold i frøene på 33%. Generelt, fremmede *C. rosea* IK 726 spiringen, når det blev tilsat frøene ved begyndelsen af forbehandlingen (lige efter iblødsætning, den såkaldte imbibering eller støbsætning). Samtidig var der som følge af behandlingen et signifikant større antal raske planter fremspiret i det neutrale væksts substrat, vermiculit.

Undersøgelser af hvilken formulering af *C. rosea* IK 726, der kunne resultere i den bedste overlevelse, viste at alle coatningsmetoder (ler-, spagnum/klid eller vaskede sporer) resulterede i et antal spiredygtige enheder, der var tilstrækkeligt ($>10^3$ cfu per g. frø) til bekæmpelse af sygdomme på andre frøarter. Observationer i mikroskop af et fluorescerende gfp-mærket isolat af IK 726 viste især mycelie vækst på frøets testa, og hvor radiclen bryder frem under spiring.

Antagonisternes bekæmpelsesevne blev undersøgt i tre markforsøg. Det første års forsøg bestod af en sammenligning af de fire anvendte antagonister. Andet år afprøvedes tilførselsmetoder af IK726 og TRI003; og i det tredje år blev IK726 kombineret med to frøpartier og to forskellige forbehandlingsslængder. Parallelt med andet års markforsøg blev der også undersøgt om tilsvarende behandlinger kunne resultere i bekæmpelse af *Pythium ultimum* var *ultimum* tilført jord i et smitteforsøg i potter i vækstkammer.

Undersøgelserne viste at TRI003 og *C. rosea* IK726 i flere sæsoner kunne fremme spiringen i marken (statistisk signifikant). I det første markforsøg, hvor coatingen skete umiddelbart før udsåningen (altså efter forbehandlingen) sås bedst effekt af TRI003, hvor fremspiringen ved første tælling var 23% imod 19% i kontrollen. I 2003 viste resultaterne af behandlinger, hvor antagonisterne coatedes på frøene ved forbehandlings start (efter støbsætning), at spiringen kunne være øget med over 100% nemlig fra 10% spiring i kontrollen til 23% og 22% i de to behandlinger (TRI003 og IK726) og 18% i lerbehandlede. Samtidig var der i dette forsøg statistisk signifikant effekt af IK726 ved anden opgørelse, hvor der var 42% raske planter ved IK726 -coatede med ler før forbehandling - mod 27% i kontrollen. I forsøgets tredje år viste der sig kun at være effekt i marken for et frøparti, når det var forbehandlet for kort tid i forhold til det optimale for dette parti. Her resulterede IK726 i en fremspiring af raske planter i marken på 26% mod 19% i kontrollen. Vejræssigt var der stor forskel på de tre år, hvor der det sidste år var et meget koldt forår.

Smitteforsøget med *Pythium ultimum* var *ultimum*, der blev udført parallelt med markforsøget 2003 i potter i vækstkammer med samme behandlinger viste at IK726 og TRI 003 var i stand til at bekæmpe et jordbærent smitstof under disse forhold. Antallet af fremspirede planter var højere i behandlinger med lerformuleret *Clonostachys rosea* IK726 og *Trichoderma harzianum* TRI 003 i forhold til lerbehandling alene (statistisk signifikant).

Sammenfattende viste forsøgene med biologisk bekæmpelse at

- præparaterne TRI003 (*Trichoderma harzianum*) og *C. rosea* IK726 kan fremme spiringen i *Abies nordmanniana* frøbede.
- *C. rosea* IK726 har vist evne til sygdomsbekæmpelse af såvel frøbårne patogener som jordbærent *Pythium ultimum* og TRI003 demonstrerede også effekt mod sidstnævnte jordbårne patogen
- der var højest plantetal i marken, hvor fremspiringsperioden var kort, enten dette skyldes brug af et vitalt frøparti eller gunstige fremspiringsforhold i marken. Men antagonistbehandlinger gav øget fremspiring for vitale frøpartier under suboptimale forhold, som f.eks. tilstedeværelsen af patogener, ukorrekt stratificeringslængde eller dårlige dyrkningsforhold.

Samlet set viser forsøgene at effekten af antagonister kan variere fra år til år. De positive tendenser der ses ved antagonistbehandlinger integreret i forbehandlingen giver dog grundlag for at optimere virkningen med henblik på anvendelse i praksis på lidt længere sigt.

Undersøgelserne omfattede også regulering af dyrkningstiltag som nedsat udsædsmængde og udlægning af sandlag før udsåning. Fra resultaterne kunne der ikke påvises gunstig effekt af disse tiltag.

Summary

Damping-off during nursery production of conifer seedlings is a serious problem in Denmark. Soil-borne fungal infections can result in mortality of pre-emergence seedlings as well as post-emergence symptoms. Seed-borne fungi such as *Fusarium* spp., which can proliferate during stratification of forest seeds, can also add to the overall problems in the field. Fungal diseases can be partly controlled using fungicide seed treatments and especially by use of soil fumigants. However, particularly from an environmental point of view, alternatives to the very intensive soil fumigation are needed. Caucasian fir (*Abies nordmanniana*) plants are produced on a large scale as Christmas trees, and seedling production is the first phase of this production involves very high levels of pesticide use.

The objectives of this work were to: (i) identify the major pathogens involved in seedling diseases of Caucasian fir in the nursery, (ii) test the impact of different biological (antagonistic) seed treatment measures on seedling emergence and survival in the field and (iii) optimize biocontrol methods in combination with the available seed technology. Four different antagonists were included: three commercial products: 1) TRI 003 and 2) Supresivit, both based on the fungus *Trichoderma harzianum* and 3) FZB Biotechnik GmbH9, based on the bacterium *Bacillus subtilis*. Additionally 4), the near commercial fungal isolate *Clonostachys rosea* isolat IK726 was included as it has shown good effect in other cultures and stimulation of seedling emergence when coated on seeds in different wet-seed technologies such as seed priming of carrots. The field experiments were carried out at Fosdal Nursery under the Danish Forest and Nature Agency, where pesticide-free production was being implemented in 2002.

By applying baiting technique and pathogenicity testing of isolates on soil samples from the nursery, it was demonstrated that damping off was caused by soil-borne *Pythium ultimum* var *ultimum* and other *Pythium* spp., while post-emergence diseases such as top decay were caused by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium redolens*. The most important seed borne fungi was *Fusarium oxysporum*. Also *Papulaspora immersa*, although not previously reported to be pathogenic, caused diseased seedlings in an inert growth substrate (vermiculite). Seed lots of varying vigour and dormancy were stratified for three and six weeks respectively and coated with *C. rosea* IK726 before and after stratification. Stratification was carried out at 3°C and 33% seed moisture content. In general, treatment with *C. rosea* IK726 after imbibition at the beginning of the stratification period, resulted in improved germination. Moreover, the treatment resulted in a significantly higher number of healthy seedlings in the inert medium, vermiculite.

Investigation into survival of *C. rosea* IK726 in different formulations showed that coating with either peat/bran or clay formulations or washed spores resulted in cfu numbers on seeds at levels previously shown to be adequate ($>10^3$ cfu per g seed) to control seed-borne diseases in other species. Microscopy of the fluorescent gfp-transformant of IK726 revealed that mycelial growth could be observed particularly on the testa of the seed, including where the radicle emerges during germination.

The effect of the antagonists was investigated in three field experiments. In the first year, the four antagonists were compared and in the second year different application methods were tested on IK 726 and TRI003. In the third year, treatment with IK726 was combined with tests of two seed lots and two periods of stratification. Also in the second year, a parallel growth chamber trial was made on control of *Pythium ultimum* var *ultimum* artificially inoculated soil.

The results from these experiments showed that TRI003 and *C. rosea* IK726, improved germination in the field (statistically significant) in more than one season. In the first field experiment (2002), where seed coating was just before sowing, TRI003 was the best treatment at the first assessment resulting in 23% germination compared to 19% in the untreated control. In 2003 treatments, coating before stratification resulted in 100% improved germination i.e. from 10% in control to 23% and 22% for TRI003 and IK 726, respectively at the first assessment. At the second assessment, IK726 coated with clay before stratification resulted in 42% healthy plants compared to 27% in the control. In the 3rd year of the experiments, only a vital seed lot that had been sub-optimally stratified was statistically improved with respect to germination percentage by IK726 treatment before stratification, resulting in a germination of 26% healthy plants compared to 19% in control. The weather varied greatly from year to year, with the spring of 2004 being particularly cold.

The growth chamber experiment with artificially inoculated *Pythium ultimum* confirmed that clay formulated TRI003 and IK726 improved healthy plant stand when seeds were treated pre-stratification.

It can be concluded that

- the biocontrol agents TRI003 (*Trichoderma harzianum*) and *Clonostachys rosea* IK726 can improve germination in *Abies nordmanniana* seed beds.
- *C. rosea* IK726 can control seed-borne pathogens as well as soil-borne *Pythium ultimum* and TRI003 has an effect against this soil-borne pathogen
- In the field the highest number of germinated plants was registered when the time of germination was short, due to either use of high-vigour seeds or optimal field conditions. However, antagonist treatment resulted in improved germination of vigorous seeds under suboptimal conditions e.g high infection potential, sub-optimal length of stratification or adverse field conditions.

Overall, we conclude that the practical use of biological control in forest nurseries is pre-mature but the perspectives for further development of biocontrol integrated in a seed technology including stratification are good.

This report also covers work done on seed density and soil texture. Different levels of seed sown per m² and application of sand in the field before sowing were investigated but no beneficial effects could be demonstrated from these measures.

1 Introduktion

1.1 Baggrund

Barrodsproduktion af frøplanter er første led i produktionen af juletræer og pyntegrønt, et led hvor pesticidbelastningen er kritisk høj. Således er den største mængde af fungicider anvendt i skovbruget knyttet til brugen i planteskolerne. Af miljømæssige årsager er denne brug søgt minimeret blandt andet ved en aftale af 3. november 1998, der er indgået mellem Miljøministeriet og Amtsrådsforeningen om afvikling af plantebeskyttelsesmidler på offentlige arealer. Derfor søger også Skov- og Naturstyrelsens Planteskoler at afvikle forbruget af kemiske plantebeskyttelsesmidler og iværksætte brugen af alternative foranstaltninger.

I Nord-Europa anses *Pythium* generelt for den dominerende skadevolder i nåletræsfrøbedene (Kozłowski & Métraux, 1998). Dette stemmer overens med, at det i Danmark er fundet, at *Pythium* er den primære skadevolder på *Abies nordmanniana*, men endvidere ses *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. og mere sjældent *Chalara* sp., *Cylindrocarpon destructans* og/eller *Verticillium* sp. også i frøbedene (Lene Petersen pers. inf). Der er usikkerhed om, hvilke patogener, der er mest betydende, men der er ingen tvivl om, at rodbrand i ædelgran frøbede forårsages af et kompleks af forskellige jordbårne patogener.

Angrebet sætter tidligt ind i kulturen. Ved inokulering af *Picea abies* med *Pythium ultimum* fremkaldes rodbrandsymptomer allerede efter 2-3 dage og en hel frøplante-population kan være angrebet 17 dage efter inokulationen (Kozłowski & Métraux, 1998). Angrebet af *Pythium* svampe kan fremmes af våd og sur jord, og temperaturen specielt omkring spiringstidspunktet spiller også en stor rolle. Det er således almindelig kendt at skygning, for tæt såning og vanding fremmer rodbrand (Ferdinansen & Jørgensen, 1938-39; Gillmann, 2001).

Foruden den jordbårne smitte kan der være tale om frøbårent inokulum af f.eks. *Fusarium* spp. og *Alternaria* spp. (Motta et al. 1996). Forekomst af frøbårne patogener i de danske frøpartier er ikke velundersøgt, men antages at kunne være af stor betydning alt efter frøenes adkomst og beskaffenhed.

Den naturlige mikroflora i jorden antages at komme stærkt ud af balance ved brug af kemikalier i planteskolerne. Ved at anvende en biologisk bekæmpelsesstrategi kan man søge at genskabe den naturlige konkurrence i jorden. Her kan saprofytiske mikroorganismer være nyttige, da de er lette at opformere og antages hurtige til at etablere sig i de ensartede dyrkningssystemer i planteskolerne og dermed konkurrerer med hurtigtvoksende patogener i jorden på såtidspunktet. Biologisk bekæmpelse af spiringsskadende svampe i skovplantekulturer ved brug af antagonistiske saprofytiske mikroorganismer er kun sparsomt undersøgt. Det er demonstreret at tilførsel af *Trichoderma harzianum* kan påvirke den generelle mikroflora i jorden og reducerer infektionspotentialet for nåletræssåplanter (Yakimenho & Grotnitskaya, 2000). Endvidere har et kommercielt middel Mycostop for nylig vist effekt mod *Botrytis cinera*, der er et problem som

fakultativ parasit på forud skadede småplanter (Capieau et al., 2004). I Biologisk bekæmpelsesgruppen på Plantepatologisk Sektion, KVL er der ført en bevidst selektionstrategi for udvælgelse af antagonistiske svampe, der trives i det system, de senere skal tilføres (Knudsen et al., 1997). I dette arbejde har det vist sig at den antagonistiske svamp *Clonostachys rosea* IK726 er effektiv mod spiringsskadede svampe (Knudsen, et al. 1995; Jensen et al. 2002). Endvidere er der demonstreret virkning mod *Pythium tracheiphilum* i kinakål (Møller, 2003), *Pythium ultimum* i sukeroer (Ærø Hansen, 1997; Jensen et al., 1996), *Alternaria radicina* i gulerødder (Jensen et al., 2004) og mod lagersvampene *Alternaria* og *Fusarium* spp på agern lagret ved -3°C (Knudsen et al., 2004). Svampen kan kolonisere rødder (Knudsen et al., 1996), og ved hjælp af genetisk mærkede isolater er det vist, at isolatet har bedre overlevelse på rødder end i jordmiljøet (Jensen et al., 2000a; Johansen et al. submitted). Sutton (2000) fandt at *Clonostachys rosea* er effektiv til at bekæmpe *Botrytis cinerea* i container-frøbede med kimplanter af forskellige nåletræer. I dette arbejde blev det aktuelle *C. rosea*-isolat selekteret blandt 136 i et testsystem udført i væksthuse. Forsøg har vist at en praktisk anvendelse er højest realistisk, idet det lagrede produkt er effektivt efter minimum 1 år og i en formulering, der indebærer en så lav mængde, at det vil indebære realistiske produktionsomkostninger (Jensen, 2000).

Bacillus subtilis har vist sig effektiv mod *Rhizoctonia* i kartofler (Wicks et al. 1995). Præparatet FZB24 fra FZB Biotechnik er baseret på *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens*. I Biologisk bekæmpelsesgruppen på KVL er der gjort erfaringer med *Bacillus subtilis* (Wulff, 2002) og produktet FZB24 er anvendt mod *Rhizoctonia solani* på fremspirende kartofler i vækstkammer såvel som i markforsøg med et godt resultat (Knudsen, 2000).

Trichoderma-baserede kommercielle produkter er udviklede til bekæmpelse af *Pythium* i grøntsager. De fleste *Trichoderma*-præparater er baseret på isolater, der virker ved kolonisering af værtsvæv (f.eks sår) inden patogenerne angriber planten (Green & Jensen, 2000). Derfor har *Trichoderma*-præparaterne været forholdsvis succesfulde over for jordbårne sygdomme, især i væksthuse (Jensen & Lumsden, 2000). Der er påvist rodkoloniserende evne af *T. harzianum* (Ahmad & Baker 1987), der er udnyttet blandt andet i præparatet TRI 003 (Harman, 1996).

Biologiske bekæmpelsesmidler kan tilføres frø før eller efter stratificering. Ved stratificering ophæves frøhvilen gennem kuldebehandling af opfugtede frø ved 2-3°C. I *Abies nordmanniana* skal frøene stratificeres 3-6 uger før såning i marken. Ved anvendelse af antagonister under stratificering vil det derfor være et krav at et præparat kan overleve og gerne opformeres ved lave temperaturer og fugtige forhold. Stratificerings-metoden har visse ligheder med priming, hvor forsøg med kombination af en sådan behandling og bejsning af gulerodsfrø med *Clonostachys rosea* IK726 har haft en særdeles god effekt i forhold til at hæmme angreb af *Alternaria radicina* og dermed fremme spiringen (Jensen et al. 2004). Der er yderligere demonstreret god overlevelse af *Clonostachys rosea* IK726 i de første måneder på lagret agern ved -3°C og 100% R.H. (Knudsen et al., 2004).

I lyset af den forskningsbaserede viden blev der derfor antaget, at det ville være muligt at anvende antagonistiske mikroorganismer i kombination med frøbehandling til bekæmpelse af rodbrand i *Abies*-frøbede.

En anden strategi, der kunne være interessant at få belyst var, om det kan være muligt ved hjælp af teksturændringer i såbedet eller ændringer af såtætheder at opnå bedre overlevelse. Dette skal ses på baggrund af at angreb af skadevoldere ofte sætter meget tidligt ind, især i vandlidende jord i frøbedene, og angrebet synes at spredes fra frøplante til frøplante. Derfor må det antages at dræning af frøbedet, såvel som øgning af planteafstand (formindskelse af frøtæthed), kan spille en rolle for sygdomsangrebets omfang.

1.2 Hypoteser

- Patogene svampe i frøbede i skovplanteskoler tilhører svampe, der anses for mulige at bekæmpe med saprofytiske antagonistiske mikroorganismer. Sådanne patogener kan være *Pythium* spp. *Fusarium* spp og *Rhizoctonia* spp.
- Patogene svampe på frø af *Abies nordmanniana* tilhører svampe, der anses for mulige at bekæmpe med saprofytiske antagonistiske mikroorganismer. Sådanne patogener kan være *Fusarium* spp. og *Alternaria* spp.
- Det er muligt at anvende antagonistiske mikroorganismer til frøbehandling til bekæmpelse af de jord- og frøbårne patogener der forekommer ved fremspiringen af *Abies nordmanniana* i planteskolen
- Frøvitaliteten kan have betydning for antagonisternes bekæmpelsesevne
- Det er muligt at integrere en antagonistbehandling med den eksisterende frøteknologi, herunder især stratificering af frø, der anvendes til ophævelse af spirehvile.
- Det er muligt ved hjælp af teksturændringer og/eller ændret såtæthed at øge forekomsten af sunde frøplanter

Med udgangspunkt i disse hypoteser defineres i det følgende formål og delmål, hvori også de enkelte undersøgelser præciseres.

1.3 Formål

Hovedformålet med projektet var

- at undersøge mulighederne for at anvende antagonister til biologisk bekæmpelse af rodbrand og andre patogene svampe i planteskolekulturer med nordmannsgran (*Abies nordmanniana*) med hovedindsatsen på antagonisten *C. rosea* IK 726;
- endvidere undersøgte mulighederne for at optimere plantesundheden gennem kulturtekniske foranstaltninger som 1) at ændre jordteksturen ved udlægning af sand såvel over som under frø, og 2) test af forskellige såtætheder.

1.3.1 Specifikke delmål:

De specifikke delmål, der også afspejles i de følgende kapitler var:

- undersøge hvilke potentielt patogene svampe og sygdomme, der optrådte i frøbedene før forsøgsstart (Kapitel 2)

- undersøge frøpartiernes kvalitet inklusive svampe og sygdomme (Kapitel 2 & 3)
- etablering af smitteforsøg (dosis/respons) af et betydende jordbærent patogen (Kapitel 4)
- undersøge antagonisters mulighed for etablering under stratificering (kapitel 5)
- undersøge antagonisters evne til bekæmpelse af et patogen med kendt dosis/respons kurve (Kapitel 6)
- undersøge antagonisters evne til sygdomsbekæmpelse ved påførsel hhv. før - og efter stratificering (Kaptel 7)
- undersøge antagonistformuleringens betydning for bekæmpelsesevnen (Kapitel 7)
- undersøge teksturændringer og såtætheders betydning for sundheden af frøplanter (Kapitel 8)

Det praktiske perspektiv med projektet var således, at man ved anvendelse af nye eller markedsførte mikrobiologiske præparater - enten alene eller sammen med optimering af dyrkningsmæssige forhold og/eller udvælgelse af frø af høj kvalitet og vitalitet - kan opnå bedre dyrkningsikkerhed i skovplanteskoler i form af en bedre fremspiring af sunde frøplanter af *Abies nordmanniana* uden brug af fungicider

Hvis man i projektet kan opnå klare svar på betydningen af parametrene: antagonistbehandling, frøkvalitet, stratificeringslængde og såtæthed, for en forbedret fremspiring, vil projektet kunne bidrage til en videre strategi for pesticidfri produktion af *Abies nordmanniana* småplanter i planteskolen.

2 Undersøgelser af patogener i forsøgsarealet og på frø

Som forudsætning for at lave bekæmpelsesforsøg (kapitel 6, 7 og 8) undersøges det potentielle sygdomstryk ved:

- 1) Undersøgelse af forekomst af patogener i jorden i de arealer, hvor markforsøgene udføres
- 2) Undersøgelse af frøpartier for frøkvalitet og frøbårne patogener. Frøpartier, der forventedes at have forholdsvis god vitalitet og lavt indhold af svampevækst blev undersøgt. Målet var at arbejde med så sundt et parti som muligt, idet hovedformålet med projektet var at undersøge bekæmpelsen af de jordbårne sygdomme.

2.1 Svampe i forsøgsarealet

Baggrunden for udvælgelse af forsøgsareal er, at man gennem flere år i Fosdal Planteskole har iagttaget et stort udfald i fremspiring af *Abies nordmanniana* i et bestemt areal i Planteskolen. For at 1) fastslå hvilke patogene svampe, der kan forventes at forårsage problemer og 2) at opnå patogene isolat(er) til smitte- og bekæmpelsesforsøg i vækstkammer, blev der foretaget jordprøvetagninger i forsøgsarealet med efterfølgende undersøgelser.

2.1.1 Materialer og metoder

Metodik for udtagning af jordprøver.

Jordprøver blev indsamlet hvert år (2002, 2003 og 2004) således at hver jordprøve repræsenterede en blok i det senere udlagte markforsøg; dvs. i 2002: 8 prøver, repræsenterende 2 x 4 blokke i to markforsøg med antagonist og dyrkningsændringer (se kapitel 7 og 8). I 2003 og 2004 blev der taget henholdsvis 4 og 5 prøver repræsenterende de 4 og 5 blokke i de to forsøg. 16 delp prøver blev udtaget med skovl fra hver blok (diagonalt med ca. 1.5 meters mellemrum). I alt indsamledes for hver blok ca. 6 l jord. Jorden opbevaredes ved 3°C i op til 8 dage. Vandindholdet bestemtes før pladespredninger.

Svampebestemmelse ved pladespredninger.

Der blev foretaget pladespredninger på selektive medier for indikation af hyppigheder af relevante svampeslægter med potentielle patogene arter. For *Rhizoctonia solani* blev der anvendt sur PDA ("Potato Dextrose Agar") (pH=4) og antibiotika (chloramphenicol 0.5 mg per l og chlortetracyclin 0.25 mg/l). For svampene *Fusarium* spp. (*Cylindrocarpon destructans* og/eller *Verticillium* sp) blev der anvendt PDA tilsat 2.2 g/l TritonX-100 and antibiotika (chloramphenicol 0.5 mg per l og chlortetracyclin 0.25 mg/l). For *Pythium* spp. blev der anvendt 4% P₅ARP: 17g/l Difco Corn Meal Agar; Difco Bacto Agar, 25g/l; Pimaricin 5 mg/l; Ampicillin 10 mg/l; Rifampicin, 10 mg/l. *Phytophthora* isoleres på 4% P₅ARP tilsat 50 mg hymexazol.

Patogene svampe i jord bestemt ved "baiting" (fangplanter)

I 2002 blev patogene svampe isoleret ved baiting teknik. Der blev sået fem x 10 stratificerede, sundt udsende *A. nordmanniana* frø i potter for hver af de 8 jordprøver (A-H). Fremspiringen blev talt én gang ugentlig i 2½ måned. Planter der var syge efter fremspiringen blev fjernet, sygt væv skåret fra og overfladesteriliseret i 70% ethanol i 30 sek. Efterfulgt af 3 gange vask med sterilt vand vævsstykkerne blev derefter podet på selektiv agar som beskrevet i det foregående afsnit.

Patogenitetsundersøgelser:

Der udførtes patogenitetsforsøg (smitte i sterilt miljø) for at eftervise at de Kock'ske regler¹ var opfyldt for udvalgte isolater. Et andet formål var at udvælge et potent patogent isolat til bekæmpelsesforsøg i kontrolleret miljø (kapitel 6). Forspirede, sundt udseende frø (2-5 mm rod) blev udpriklede i steril jord/sandblanding. Til det spirede frø blev der tilsat en udstandset agarprop med vækst af testsvampen. Der blev aflæst 3 gange efter 3, 4 og 6 uger for fremspiring og post emergence visning.

2.1.2 Resultater

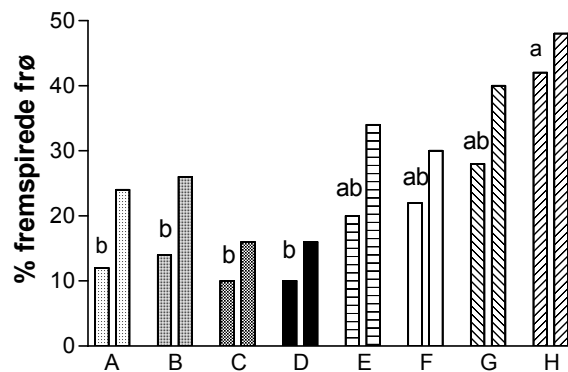
Resultater af pladespredningerne viste at der for 2002 forsøget blev fundet: > 1000 cfu ("koloniformende enheder") af *Rhizoctonia* spp; 370 cfu af *Pythium* spp og 570 cfu af *Fusarium* spp. g⁻¹ tør jord. I 2003 blev der ved pladespredninger af jord fundet mellem 80 og 200 cfu af *Pythium* spp og 2300-4900 cfu af *Fusarium* spp. g⁻¹ tør jord. *Fusarium oxysporum* (der rummer såvel saprofytiske som patogene former) var den hyppigst forekomne. I 2004 viste pladespredningerne et indhold i jorden af 110 og 600 cfu af *Pythium* spp og 300-1100 af *Fusarium* spp. g⁻¹ tør jord.

Resultatet af baiting undersøgelserne viste en fremspiring på mellem 44% og 16% og et antal af raske frøplanter på mellem 42% og 10% (fig 2.1.). Der var signifikant højere fremspiring i blok H (p < 0.0001), sammenlignet med blok A, B, C og D medens blok E, F og G havde en intermediær fremspiring, der ikke var signifikant forskellig fra de to grupper. Blok A, B, C og D udgjorde blokke for antagonistforsøget i 2002 medens de 4 andre blokke blev anvendt til texturforsøget. Undersøgelserne af post-emergence syge planter resulterede i høst af svampeisolater tilhørende: *Rhizoctonia* (1), *Pythium ultimum* (10), *Phytophthora* (1), *Cylindrocarpon* (1), *Fusarium oxysporum/redolens* (6) og *Chrysosporium pannorum* (2). 6 *Pythium* isolater, 5 *Fusarium* isolater, 1 *Rhizoctonia* isolat og 1 *Cylindrocarpon* isolat blev testede for patogenitet

Resultatet for test af patogenitet viste at 4 ud af 6 *Pythium* isolater og 5 ud af 6 *Fusarium* isolater var patogene, idet *Abies* havde dårligere fremspiring/kvalitet end usmittet kontrol. Ingen af de øvrige isolater var patogene. I overensstemmelse med det angivne fra litteraturen viste *Pythium ultimum* angrebne planter symptomer på rodbrand, der oftest forårsagede sort nedvisning af planten, medens *Fusarium* angrebet resulterede i stive planter med tophenvisningssymptomer typiske for *Fusarium oxysporum*. Et isolat af *P.*

¹ Koch 1884 og 1890, men endelig formuleret af Federation of British Plant Pathologists 1937 som Koch's postulates: (1) the suspected causal organism must be constantly associated with the disease; (2) it must be isolated and grown in pure culture; (3) when a healthy plant is inoculated with it, the original disease must be reproduced (4) the same organism must be reisolated from the experimentally infected plant (Holliday, 1989)

ultimum var *ultimum* (no 1983) blev benyttet til smitteforsøg (kap. 4) og antagonistforsøg i kontrolleret miljø (kap. 6).



Figur 2.1. Fremspiring af raske planter (venstre søjle) og totalt fremspirede inklusive post-emergence døde registreret efter 12 uger i jord fra Fosdal. A-H referer til blokke der anvendes i markforsøg. Forskellige bogstaver på søjler angiver statistiske forskelle ved Dunn (Bonferoni test ($P < 0.05$)).

2.2 Svampe på frø

Undersøgelsen havde til formål at udvælge frøpartier med lav grad af tilstedeværelse af frøbårne patogener med henblik på at optimere ensartethed i forsøgsmaterialet ved senere undersøgelser af jordbåren smitte og bekæmpelsesforsøg. Partierne blev også testet for spireevne ved forskellige stratificeringslængder (se kapitel 3).

2.2.1 Materialer og metoder

Blotter test

To frøpartier blev evalueret for svampe ved blottertest (test på filterpapir) (ISTA, 1996) med henblik på markforsøg 2002. 015/00 (Tversted F526-A3113 og 016/00 (Tversted F527-A3007) i det følgende benævnt 015 og 016. Begge partier blev høstet i 2000 (hvilket aflæses af partinummerets cifre efter skråstreg dvs. /00). Til markforsøgene 2003 og 2004 blev frø 031/02 Tversted F526 undersøgt (høstet 2002). Blotter testen blev udført foråret 2003.

400 overfladedesinficerede frø (1% NaOCl 10 min, med 3 gange efterfølgende skylning) blev inkuberet ved 20°C, i 15 dage ved NUV (nær ultraviolet lys) (ISTA, 1987) 25 stk. pr. skål. Mikroflora på frøene blev herefter undersøgt ved stereomikroskopi. Spirede frø blev registreret.

Growing on test

Tre frøpartier blev testet i en growing on test i vermiculit. Testen anvendtes til måling af spirevne og opførelse af syge planter i og efter frøplantestadiet, der kan henføres til frøsmitte (Neergaard, 1979). Partierne var: 031/02 (Tversted, F. 526.), 039/02 (Dallerup, F. 722.), 028/01 (Ambrolauri, Tlugi, Georgien). Growing on testen blev udført foråret 2004.

Frøpartierne blev kuldebehandlet (stratificeret) ved kontrolleret vandindhold (mc) 33%: 3 og 6 uger ved 5°C efterfulgt af spiring ved 20°C i vermiculite.

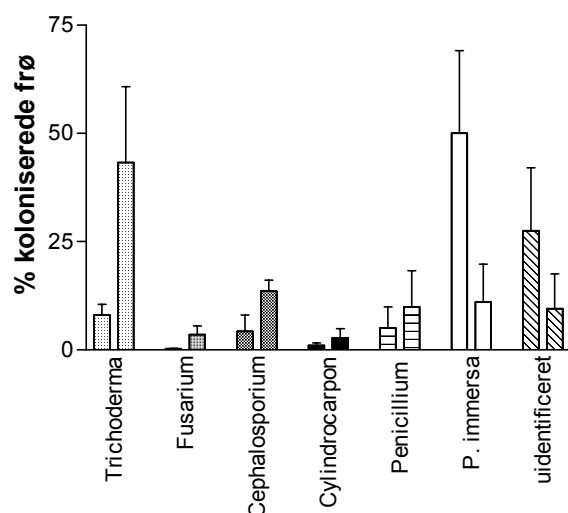
Spiring og kimplante udvikling blev registreret ugentlig og post emergence syge blev talt og taget op. Fra det syge væv blev der foretaget isolering på samme måde som planter i baitingforsøget (afsnit 2.1.1).

2.2.2 Resultater

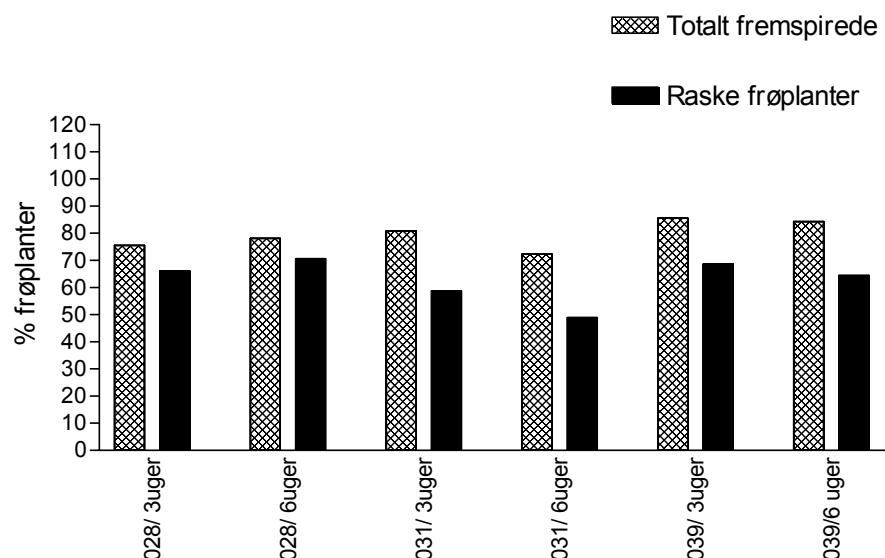
Sammenligning af parti 015/00 og 016/00 viste at parti nr. 15 var lavest inficeret med patogener (*Fusarium* og *Cylindrocarpon*: hhv 0,3% og 1%) medens parti nr 16 var inficeret med hhv. 4 % og 3 %. Dog var der for visse saprofytiske svampe en højere koloniseringsgrad for 015 i sammenligning med 016. Således var *Papulaspora immersa* koloniseringsgraden 50% sammenlignet med 11% i parti 016 (se fig. 2.2). Spiringen blev i blottertesten registreret til (015): 50% +/- 11 i modsætning til (016): 38% +/- 10%, hvilket er i god overensstemmelse med data opnået i den originale spiretest se kapitel 3, hvor der blev observeret hhv. 60% og 40% spiring.

Resultaterne af blotter testen i 2003 viste at partiet 031/02 var lavt inficeret med patogener (*Fusarium* og *Cylindrocarpon*: hhv 0,8% og 0,2%). Af saprofytiske svampe blev der i lighed med partierne, der blev testet i 2002, især fundet forekomst af *Trichoderma* (10%). *Papulaspora immersa* var til stede men blev ikke optalt. Spiringen pr. 9.4.2003 blev opgjort til 65%.

Ved growing on testen i 2004 sås et udfald af planterne (figur 2.3). Der var flest syge planter for parti 031/02 nemlig 23% og 2 % for henholdsvis 3 og 6 ugers forbehandlede sammenlignet med 10% og 6% for 028/01. Isoleringer fra de syge planter viste at 50% af planterne havde vækst af *Fusarium oxysporum/redolens*, medens 28% havde vækst af *Papulaspora immersa*.



Figur. 2.2 Svampe registreret ved blotter tests af to frøpartier. 400 frø testet pr. parti (20 gentagelser á 20 frø): 015 (første søjle) og 016 (anden søjle)



Figur 2.3. Procentvise totale fremspirede og fremspirede som udviklede færdige, raske kimplanter for 3 forskellige frøpartier af *Abies nordmanniana* stratificeret 3 eller 6 uger.

2.3 Konklusion

Det blev sandsynliggjort ved isoleringer, baitingforsøg og patogenitetstest i 2002, at de mest betydende patogener (når man vurderer både kvantitativt og kvalitativt) i forsøgsarealet var *Pythium spp* og *Fusarium spp*. Der var en god overensstemmelse mellem fund af *Pythium spp*. (*ultimum* overvejende) og *Fusarium spp*. (*oxyporum* og *redolens* overvejende) i pladespredninger og de opnåede resultater i baitingforsøget. Da jorden i forsøgsarealet med bedopbygning med sand, lille rotation i driften i planteskolen, samt ensartet topografi på arealet kan forventes at resultere i en ret ensartet mikroflora sammensætning over hele marken, hvor de tre forsøg blev udlagt, blev det antaget at pladespredninger de to følgende år alene kunne være et bud på, om der kan forventes angreb i marken. De to følgende år blev der i pladespredninger fundet værdier for *Pythium spp* og *Fusarium spp*. som var på et lignende niveau som det første år, og de tre forsøgsarealer blev derfor alle anset for brugbare til markforsøg med et forventeligt angreb i marken.

I de to første års markforsøg ønskedes frøpartier med god spireevne og lav sygdomsniveau. Den anerkendte metode til frøtest: blottertesten giver et fingerpeg, men viser ligesom pladespredninger fra jord ikke om fund af svampe er proportional med sygdom, heller ikke selv om man identificerer til arter med forventet patogenitet, idet mange arter rummer såvel patogener som saprofytiske genotyper. Overfladesterilisering er en metode til at eliminere svampe der ikke har inficeret væv, men flere saprofytiske svampe kan overleve behandlingen, deriblandt *Trichoderma spp*. Metoderne kan dog sige noget om, hvorvidt potentielle patogener er til stede. I blottertesten blev der påvist et lavt niveau af potentielle patogener *Fusarium spp*. Omvendt blev der fundet *Papulaspora immersa*, der ikke hidtil er anset for et problem på frøet. Derfor blev frøparti 015/00 anvendt i 2002 og 031/02 i 2003. Ved den efterfølgende growing on test i 2004 blev der klarlagt at *Papulaspora immersa* kan udgøre en sygdomsrisiko for frøplanter. Partiet (031/02) blev også anvendt i DJF forsøg 2004, hvor man ligeledes undersøgte partiet i blottertest.

Her blev der fundet op til 93 % koloniserede frø med ***P. immersa***, på trods af grundig sterilisering med NaOCl (Kåre Møller, pers information). Dette fund kan også tyde på at svampen kan være patogen. I 2004 havde frøpartiet 031/02 samtidig mistet noget af sin vitalitet (se kapitel 3), hvilket kan have indvirket på modtagelighed af sygdom.

Det kan således sammenfattes, at der er en stor sandsynlighed for, at de mest betydende patogene svampe, der skal bekæmpes af antagonist i de foreliggende undersøgelser er jordbårne ***Pythium*** spp. og jord- (og frø-)bårne ***Fusarium*** spp./***Papulaspora immersa***. Denne viden giver et bedre grundlag for valg af testorganismer til brug ved bekæmpelsesforsøg.

3 Frøets spireevne ved forskellige forbehandlings-længder og biologisk bekæmpelse af frøbårent smitte

For at udvælge frøpartier med en forholdsvis god spireevne til markforsøg i 2002 og 2003 samt frø af forskellig vitalitet for forsøg i 2004 blev der foretaget undersøgelse af spireevnen. Med henblik på forsøget 2004 blev undersøgelsen foretaget ved forskellige perioder af forbehandling og med og uden antagonister.

3.1 Materialer og metoder

Spireevnen blev testet på 4 gentagelser á 100 frø, forbehandlet (stratificeret) i 3 eller 6 uger ved 5°C, derefter spiret ved 23°C i vermiculite. Stratificeringen foregik efter standard procedure på Statsskovenes Planteavlstation, Humlebæk med støbsætning (iblødsætning) af frø i 12 timer i vand efterfulgt af 3-6 uger v. 2-4°C med kontrolleret vandindhold på 30-35 %, der er anbefalet for *Abies nordmanniana* (Jensen, 1997).

Første sammenlignede undersøgelse i 2002 blev foretaget på frøpartierne 015/00 og 016/00 begge F526, Tversted.

Anden undersøgelse blev foretaget vinteren 2003/2004 på partierne: 031/02 (F. 526, Tversted. Spire% = 65 i april 2003), 039/02 (F. 722, Dallerup. Spire% = 60 i maj 2003), 028/01 (Ambrolauri, Tlugi, Georgien. Spire% = 67% i april 2003). *C. rosea* IK726 indlejret i ler og ler alene blev pålagt frø før eller efter stratificeringen. Inokulum indeholdt 4×10^9 cfu pr. g. 0.005 g inokulum coates pr g vådt frø svarende til 2×10^7 cfu (kolonidannende enheder) pr. g frø (beh 3, 4, 7 og 8). På lerbehandlede coatedes 0,005 g ler pr. g vådt frø. For hvert frøparti var der følgende behandlinger, som blev lavet på fire gentagelser af 50 frø:

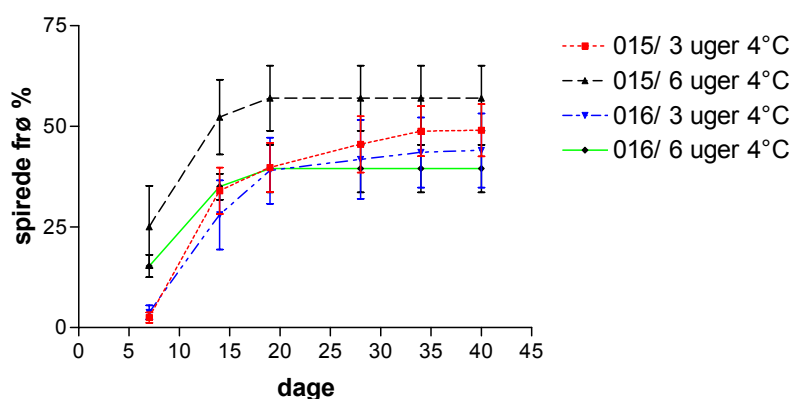
- | | | |
|-----------------------|---|---------------------------------------|
| 1. 6 uger + ler | } | (Før stratificering = pre coatede) |
| 2. 3 uger + ler | | |
| 3. 6 uger + 726 + ler | | |
| 4. 3 uger + 726 + ler | | |
| 5. 6 uger + ler | } | (Efter stratificering = post coatede) |
| 6. 3 uger + ler | | |
| 7. 6 uger + 726 + ler | | |
| 8. 3 uger + 726 + ler | | |
| 9. 6 uger ubehandlet | | |
| 10. 3 uger ubehandlet | | |

Umiddelbart efter pre-coatning (behandling 3 og 4), efter kuldebehandling af pre-coatet frø (behandling 3) og efter post-coatning (behandling 7 og 8) blev der udtaget frø til bestemmelse af dækningsgrad (ved pladespredning).

Spiring og kimplante udvikling blev registreret indtil kimplanterne havde udviklet kimblade og smidt frøet (normal kimplante), uspirede frø blev skåret igennem og registreret som enten tomme, døde eller friske. Spireprocenten blev i dette tilfælde beregnet på basis af fulde frø (dvs. totalt antal frø – antal tomme frø). Antallet af kimplanter som døde inden de havde udviklet sig til en normal kimplante blev også registreret.

3.2 Resultater

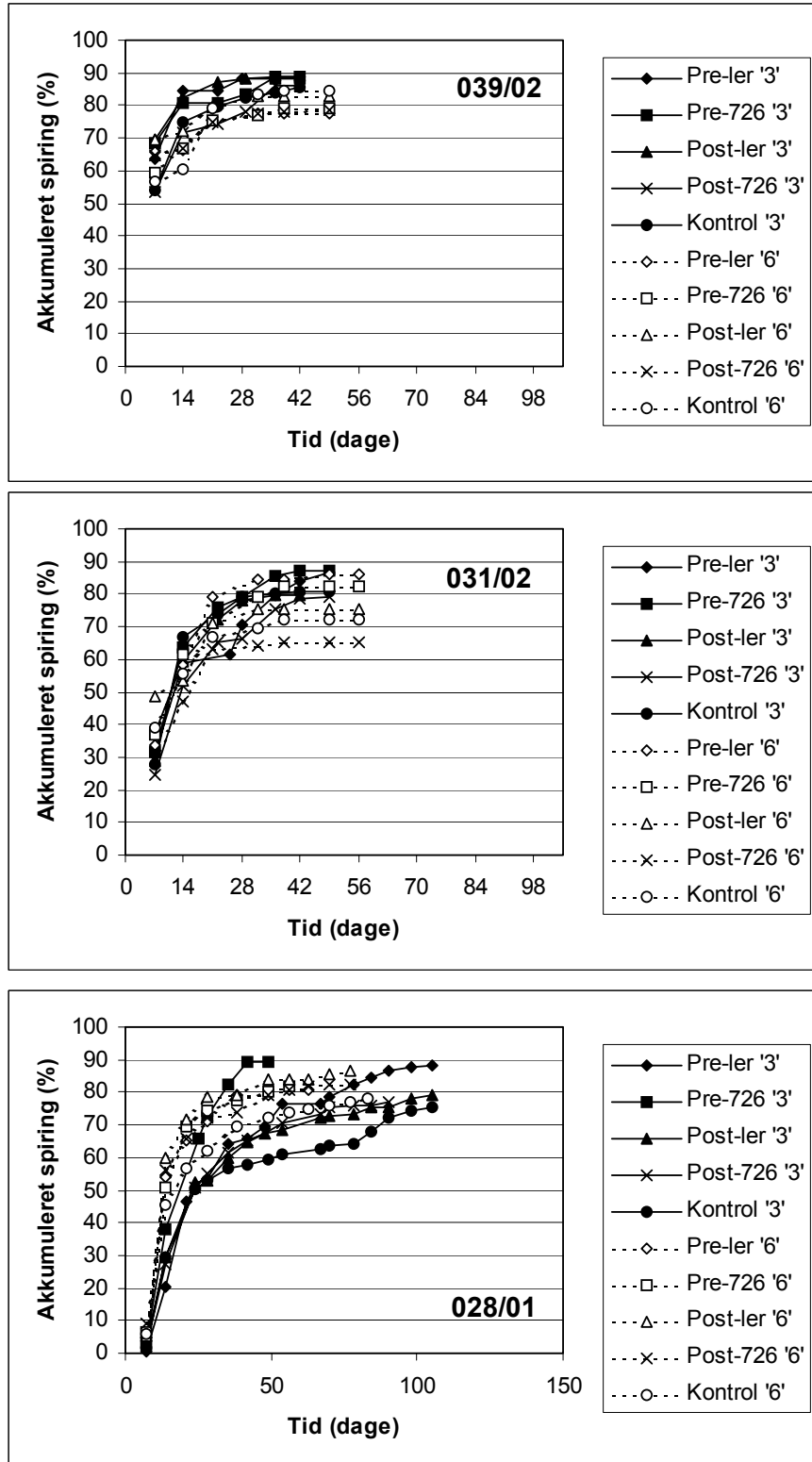
Spireprocenterne for de to frøpartier i første undersøgelse viste en total fremspiring efter 6 ugers forbehandling for 015/00 = 60% (efter 14 dage = 55%) og for 016/00 = 40% (efter 14 dage = 34%). Resultatet viste at parti 015 havde højest spireevne og stratificering i 6 uger af dette parti resulterede i den højeste spiring (se fig. 3.1)



Figur 3.1. Spireprocent \pm SD for frøpartierne 015/00 og 016/00 efter hhv. 3 og 6 ugers stratificering

Ved den anden undersøgelse sås at de danske partier 039/03 og 031/02 havde en lettere frøhvile end det Georgiske frøparti, 028/01. Seks ugers forbehandling af 039/02 og 031/02 er således længere end nødvendigt og giver gennemsnitlig dårligere spireprocenter end ved 3 ugers forbehandling. (fig. 3.2) Seks ugers forbehandling af 028/01 giver en hurtigere fremspiring end tre uger, men har ingen effekt på den gennemsnitlige spireprocent.

Spireprocenterne fra vinteren 2003/04 i fig. 3.2. er ikke direkte sammenlignelige med spireprocenterne fra foråret 2003 pga. at der ikke er brugt samme beregningsmetode. Men hvis spireprocenterne beregnes på basis af alle frø lagt til spiring (inkl. tomme frø), var spireprocenterne for hhv. parti 039/02, 031/02 og 028/01 på hhv. 56, 48 og 63%. Dvs. partierne 028/01 og 039/02 næsten ikke havde tabt spireevne i den mellemliggende periode, hvorimod parti 031/02 havde tabt 17%.



Figur 3.2. Spiringen målt ugentlig over 3 måneder af 3 Abies frøpartier: Dallerup 039/02; Tversted 031/02 og Georgien 028/02.

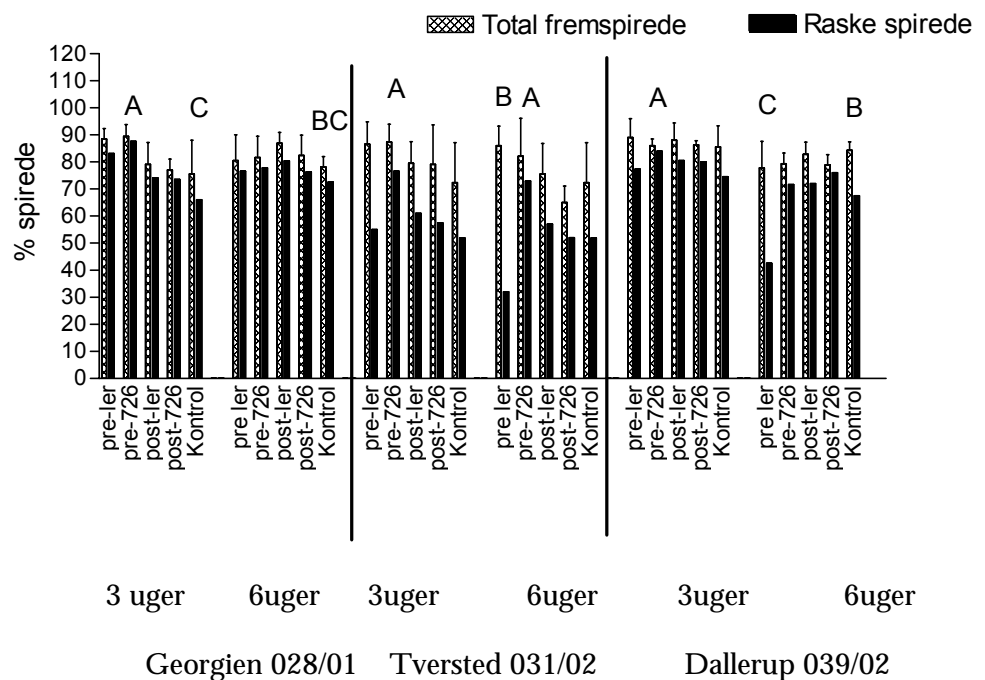
Antagonistbehandlingerne viste at dækningen var ensartet både målt lige efter dækningen og ved udsåningen (se tabel 3.1)

Tabel 3.1 Spiredygtige enheder (cfu) af svampen *C. rosea* IK726 coatede på frø før eller efter stratificering. Angivelser er per g frø.

	Cfu ved behandling	Cfu ved udsåning
Pre 726 -6 uger	$1,1 \times 10^7$	$3,9 \times 10^6$
Pre 726 - 3 uger	$1,3 \times 10^7$	$3,9 \times 10^6$
Post 726 6 uger	$4,5 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$
Post 726 3 uger	$1,3 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$

Pladespredning efter 3 ugers kuldebehandling af IK726 behandlet frø (behandling 3) viste en reduktion med faktor 3; og efter 6 ugers kuldebehandling af IK726 behandlet frø (behandling 3) en total reduktion med faktor 18.

Af spireresultaterne (fig. 3.2) fremgår at der er en tendens til (dog ikke statistisk signifikant jfr variansanalyse, SAS, Proc.GLM) at pre-ler og pre-726 behandlingerne giver højere spireprocent end kontrollerne efter tre ugers forbehandling, dette gælder især 028. Efter seks ugers forbehandling af 028 ses der en positiv effekt af såvel post-ler som post-726. Generelt var der dog ikke nogen effekt af post-726 behandlingen. Efter fremspiringen døde nogle af kimplanterne (fig. 3.3). Imidlertid viste der sig en tendens for alle behandlinger,



Figur 3.3. Procentvise totale fremspirede og fremspirede som udviklede færdige, raske kimplanter for 3 forskellige frøpartier af *Abies nordmanniana* stratificeret 3 eller 6 uger og +/- behandlede med *C. rosea* IK 726. Signifikant forskellige markeret med forskelligt bogstav jfr T test for variable (Bonferroni (Dunn test)).

at pre-726 (før stratificering) nedbragte antallet af post emergence døde. Der var et statistisk højere antal af raske planter for de pre-726 behandlede frø af parti 031 (både for 3 og 6 ugers forbehandlede sammenlignet med pre-ler kontrol; for 028, 3 ugers forbehandlede sammenlignet med ubehandlet kontrol

og for 039 for 3 ugers forbehandlede (her dog kun sammenlignet med kontrollen: pre-ler med 6 ugers forbehandling).

3.3 Konklusion

Frøpartiernes spireevne sammenholdt med forekomsten af frøbårne svampe gjorde det muligt at træffe valg med hensyn til hvilke frøpartier man kunne anvende i markforsøg, og hvilke forbehandlingstidspunkter der var optimale for det enkelte frøparti.

Resultatet viste at antagonisten *C. rosea* IK 726 var fordelagtig at påføre før stratificering. Selv om koncentrationen af levedygtige sporer ved udsåningen er noget lavere end ved inokuleringen, er den resulterende koncentration på frøene ønskværdig høj til bekæmpelse under markforhold (Jensen et al. 2002). Den opnåede bekæmpelseeffekt af antagonisten overfor frøbårne sygdomme ved påførsel efter imbibering af frøene er i overensstemmelse med effekten overfor *Alternaria* på gulerodsfrø (Jensen et al, 2004). Her øges effekten ligeledes når antagonisten tilsættes ved imbibering i primings teknikken.

Ud fra disse resultater konkluderes at det ville være interessant at få afprøvet i markforsøg hvorledes kombinationen af eventuelle frøbårne svampe, forbehandling (fremspirings-hastighed) og antagonist-behandling kunne indvirke på fremspiring og overlevelse under markforhold med smittetryk. Markforsøget blev udført 2004, beskrevet i kapitel 7.

4 Smitteforsøg med *Pythium ultimum* var *ultimum*

For at undersøge mulighederne for biologisk bekæmpelse under markforhold ønskedes der et kendskab til bekæmpelsesevnen af antagonist overfor et enkelt betydningsfuldt patogen. Derfor måtte der udarbejdes et dosis/respons forsøg med henblik på at udarbejde retningslinier for tilsætning af passende dosis af inokulum i antagonistforsøget. Her er det vigtigt at man ikke tester i en urealistisk lav eller høj koncentration. Smitteforsøg sker med det mest hyppigt fremtrædende patogen: *Pythium ultimum* var *ultimum*. Isolatet 1983, der er isoleret fra baitingforsøget fra Fosdal jord (kapitel 2) blev anvendt.

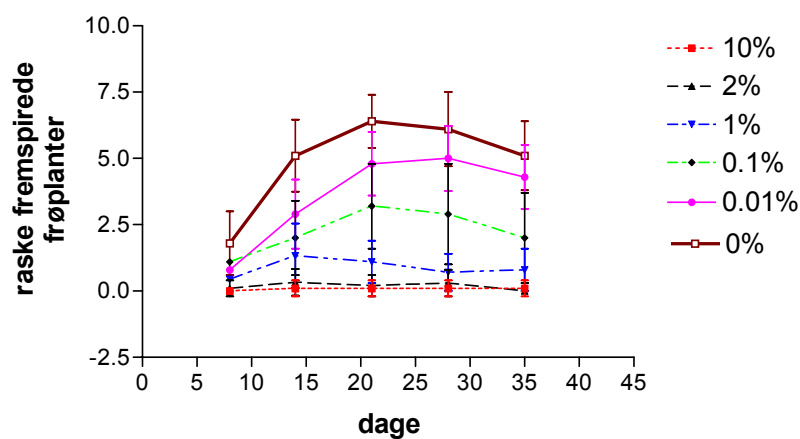
4.1 Metode

Inokulum af *Pythium ultimum* var *ultimum* isolatet 1983 produceres i sphagnum/ klid/ vand i forholdet 1:1,7:3,8 i 14 dage ved 20°C. Inokulum blev herefter nedtørret i et døgn ved stuetemperatur ved laminar flow hvorefter det blev findelt med kaffemølle. Det findelte inokulum blev pladespredt og inokulum koncentrationen fastlagt til 120 cfu (kolonidannende enheder) pr g.

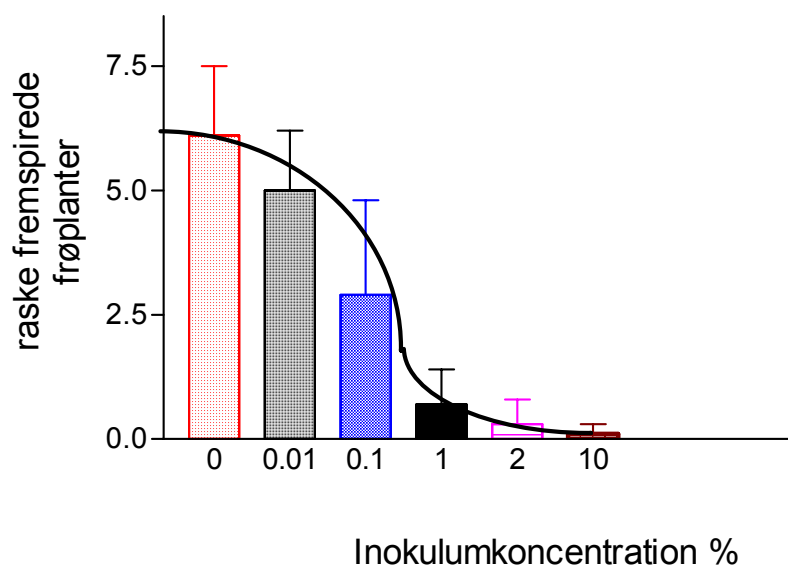
Smitteforsøg udføres i steril jord/sand (4:1) blanding i pottforsøg i vækstkammer. Jordblandingen fyldes i potter Ø 10 cm, indtil 5/6 opfyldning og der vandes til markkapacitet. Herefter tilføres 25 g sterilt sphagnum/sand (4:1) iblandet 5 forskellige niveauer af patogenet: 10%, 2%, 1%, 0,1%, 0,01% og kontrol (0%). Smitstoffet tilføres potterne således at 1) halvdelen af sphagnum/inokulum hældes i potterne; 2) 7 stratificerede forspirede frø med 2-4 mm spirelængde udsås; og 3) resten af sphagnum/inokulum drysses over frøene. Der overbruses forsigtigt med vand. Forsøget udføres med 9 gentagelser i randomiseret blokforsøg. Bakker med potterne overdækkes og stilles ved 15°C. Der opgøres efter 7d, 14d, 21d, 4 uger, 5 uger og 6 uger.

4.2 Resultat

Forsøget resulterede i et sygdomsniveau, der nøje afspejlede inokulumkoncentrationen se fig. 4.1. Hvis man sammenligner sygdomsniveau ved en enkelt opgørelse f.eks. efter 28 dage ses en typisk S-formet dosis-responskurve se fig. 4.2.



Figur 4.1. Antal raske Abies frøplanter pr potte (med 7 såede frø) i smitteforsøg med parti O15 stratificerede og forspirede i sterilt jord/sand tilsat *Pythium ultimum* var ultimum 1983 i overfladejorden ved 6 smitteniveauer fra 0% til 10%



Figur 4.2. Antal raske fremspirede nordmannsgran frøplanter efter stratificering og forspiring i sterilt jord/sand tilsat *Pythium ultimum* var ultimum 1983 i overfladejorden ved 6 smitteniveauer fra 0 % til 10 % - (med 7 såede frø) aflæst efter 28 dage. Tilnærmet asymptotisk dosis- respons kurve indtegnet.

4.3 Konklusion

Med den opnåede dosis-respons kurve kunne en anvendelig inokulumkoncentration til bekæmpelsesforsøg fastlægges. Ved antagonistforsøg anvendtes således inokulumkoncentrationer fra 0.1% til 1%, idet bekæmpelseeffekten bør undersøges i det "lodrette" felt af sygdomskurven (fig. 4.2). Anvendelse af lavere dosis ville give stor usikkerhed og ved den højeste dosis vil en lille bekæmpelseeffekt ikke rykke angrebsgraden.

5 Antagonistkolonisering af frø

5.1. Undersøgelse af dækningsgrad af *Clonostachys rosea* IK726 ved tre forskellige typer formuleringer

Tre forskellige formuleringer af *C. rosea*: ler, spagnum/klid eller udvaskede sporer blev undersøgt med formålet at undersøge den optimale tilførsel af antagonist set i forhold til overlevelse på frøet. Dette blev undersøgt i sammenhæng med stratificering

5.1.1 Materialer og metoder

Tre formuleringer lerinokulum, spagnum klid og vaskede sporer blev tilført frøene som vandige opløsninger indeholdende i alt 2×10^7 cfu (kolonidannende enheder) pr ml der tilsættes som 20 ml suspension til 120 g frø. Frøenes vandindhold (mc) blev holdt på 33% (justeret ved tørring og opfugtning). Frøene blev opbevaret ved 3°C.

Antallet af spiredygtige enheder blev målt ved pladespredning (lige efter coatningen og efter 8 dages stratificering) og ved dækningsgrad målt på frø stratificeret 8 dage, og derefter inkuberet på fugtigt blottet papir i 8 dage (NUV, 20°C) og derefter aflæst ved stereomikroskopi. Der blev bedømt efter en skala fra 0 til 3 for dækningsgrad. Karaktererne var følgende: lidt vækst: 1, ca halvdelen af frøene dækket: 2 og mere end 2/3 dækket: 3.

5.1.2 Resultater

Den sammenlignende undersøgelse af 3 formuleringer (1. sphagnum/klid, 2. udvasket sporesuspension fra sphagnum/klid og 3 ler) resulterede i følgende: Umiddelbart efter coatningen viste pladespredningerne lavest mængde cfu i coatningen med den udvaskede spore-suspension (2) og efter 8 dages stratificering var forholdet således at der var 3 gange så høje mængde cfuer på pladespredninger fra frø med spagnum/klid formuleringen (1) som fra frø coatede med sporesuspensionen (2); og fra frø coatede med lerformuleringen (3) var der >5 gange så mange cfuer, som fra frø med sporesuspension (se tabel 5.1).

Tabel 5.1. Resultat af sammenlignende test af overlevelse af *Clonostachys rosea* IK726 ved forskellige formuleringer

	Cfu* efter coatning	Cfu efter 8 dages stratificering	Karakterer i blottet test
Spagnum/klid	$2,5 \times 10^5$	$4,5 \times 10^4$	2,2 +/- 0,07
sporesuspension	$1,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	1,9 +/- 0,6
lerinokulum	$2,3 \times 10^5$	$8,5 \times 10^4$	2,0 +/- 0,3
vand	0	0	0**

* cfu= kolonidannende enheder pr. g frø

** Høj frekvens af *Penicillium*

Resultater fra blotter testen viste ikke signifikant forskel i dækningsgrad ved de tre coatninger, der alle lå på et gennemsnit omkring 2,0 (dvs. at frøene var ca. halvt dækkede med *C. rosea*). Den kraftigste sporulering sås ved spagnum/klid formuleringen.

5.2 Vækst af *C. rosea* på frø undersøgt ved anvendelse af gfp-mærket isolat

For yderligere at klarlægge hvorledes koloniseringen af *C. rosea* foregår på frøet blev der udført et forsøg - hvor frø blev behandlet med antagonisten ved begyndelsen af stratificeringen. Coatning skete med en gfp-mærket *C. rosea* (d 11). GFP genet er isoleret fra bioluminescent vandmand og indsat i *C. rosea* IK726 ved kontrol af konstitutiv gpd promotor og trpC terminator begge fra *Aspergillus niger*. GFP genet bevirker, at det resulterende gfp-protein fungerer som reporter molekyle for gen expressionen, hvorved aktiv vækst af den mærkede svamp kan følges ved fluorescence mikroskopi (Lübeck et al., 2002).

5.2.1 Metode

Tre portioner af frø anvendes til stratificering. Stratificeringsprocessen følger den tidligere beskrevne procedure (afsnit 3.1).

1g sphagnum/klid inokulum indeholdende *C. rosea* d11 vaskes i 10 ml vand og filtreres. Sporekoncentration i suspensionen er 1.3×10^8 . To hold frø á 5 g rystes med 1.7 ml sporesuspension, der resulterer i m.c. på 33%. Det ene hold tilføres 0.1% af det farvede bindemiddel, sepiret. Det tredje hold frø tilsættes vand alene.

Frøene stilles ved 3°C i plastpetriskåle i plastpose med mulighed for ilttilførsel, men med lav fordampning. Frøene omrystes dagligt og hver uge justeres vand efter vægt til 33% mc i frø.

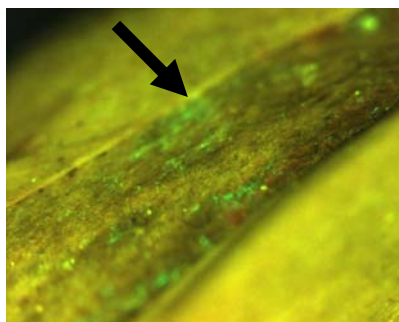
Der foretages ugentligt mikroskopi i Leica fluorescens stereomikroskop med et gfp filtersæt med 480 nm excitationsfilter og 510 nm barriere filter.

5.2.2 Resultat

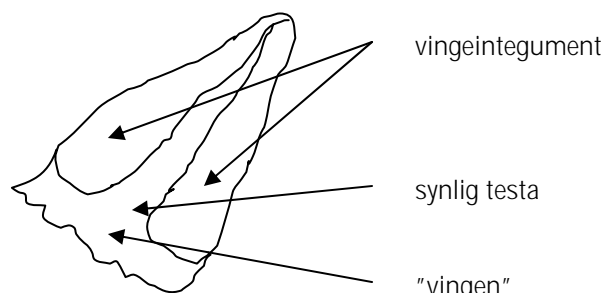
Ganske svag mycelie vækst af *C. rosea* kunne observeres på frøene, men der var også vækst af andre svampe. På frøets overflade blev der iagttaget mindre vækst på vingintegumentet sammenlignet med den synlige testa (inklusive den tynde vinge (fig. 5.1). Testa ligger synlig blottet i en spalte dannet af det øvre vingintegument (fig. 5.2). Her er der en jævn dækning efter 5 dage ved 3°C. og efter 14 dage ses samme dækningsgrad. Efter 21 dage findes der sporulerende *C. rosea*. Der var ikke synlig forskel på væksten +/- sepiret

5.2.3 Konklusion

Det er gode perspektiver for en coatning samtidig med stratificeringen, idet antagonisten overlever kuldebehandlingen af frøet. Der er noget der tyder på, at der kan være forskel i overlevelsen af sporer efter coatningsmetode, men at dette muligvis kan kompenseres i vækst. Det skal dog understreges at blotter testen ikke vil afspejle situationen i jorden, men kun kan give en antydning af potentialet af svampen.



Figur 5.1. *Abies* frø coatede med gfp mærket *C. rosea* IK726 og stratificeret. Detalje fra testa efter 5 dages stratificering . Eksempel på særlig tæt vækst ved pilen



Figur 5.2. Principskitse af *Abies nordmanniana*-frø

Alle coatningsmetoder resulterer i et antal spiredygtige enheder, der ser realistiske ud i forhold til bekæmpelseeffekter (Jensen et al., 2002). En uvasket sphagnum/klid inokulering giver ekstra næring til antagonisten, hvilket kunne afspejles i en større grad af sporulering, når frøene inkuberedes ved en høj temperatur. En sådan næringstilførsel kan imidlertid også tænkes at være et problem, hvis frøene i forvejen har en naturlig mikroflora der kan ernæres og derved skade fremspiringen. Omvendt kunne en udvasket suspension (uden næring) give færre spiredygtige enheder på frøet, men svampen var dog i stand til at vokse og etablere sig, især hvor frøet udskiller exudater. Dette blev iagttaget ved, at der var en væsentlig forskel på vækst på de enkelte frødele, afspejlende de forskellige vækstbetingelser, der er til rådighed. En kolonisering på den synlige testa må forventes at være bæredygtig i forhold til beskyttelse, hvor spiringen af frøet foregår.

Der var ikke synlige hæmninger (eller forbedret coating) ved anvendelse af et farvet bindemiddel, Sepiret der kan "sladre" om fordelingen af antagonisten på frøet ved coatingen.

6 Antagonistforsøg i kontrolleret miljø med *Pythium ultimum* smitte

Med henblik på at øge kendskabet til antagonistiske egenskaber over for et enkelt patogen, der har betydning i planteskolen udførtes pottforsøg med tilført smitstof af *Pythium ultimum* var *ultimum*. Isolatet 1983, der er isoleret fra baitingforsøget fra Fosdal jord (kapitel 2) og testet i smitteforsøg (kapitel 4) blev anvendt .

6.1 Antagonistforsøg 2002/2003

Der blev udført et forsøg hvori indgik antagonisterne: *Clonostachys rosea* IK726, Supresivit, TRI 003 og en mælkesyrebakterie (leveret af Birthe Jelle, Chr. Hansen A/S, specifik stamme fortrolig). Øvrige præparaters oprindelse se tabel 7.1. Udvalgelsen af antagonister til bekæmpelsesforsøg skete i forhold til: 1) kendt effekt mod *Pythium* og *Fusarium* svampe 2) kommerciel tilgængelighed og 3) mulighed for rodkolonisering. Endelig blev mælkesyrebakterier medtaget for sammenligning i denne test på grund af deres generelle antifungale virkning.

Frøpartiet var det tidligere anvendte og testede parti, høstet 2000, testet 2002 ((015/00 Tversted F526- A3113). I forsøget indgik parametre som post-coatning (efter stratificering) og precoatning (før stratificering) samt forskellige smitteniveauer af patogenet: 0,1 %, 0,5 % og 1 %. Endvidere indgik forskellige typer af applikationsmetode for *C. rosea* IK 726: 1) sphagnum/klid formulering, 2) lerformulering og 3) en udvasket sporesuspension. I tilknytning til forsøget blev der foretaget pladespredninger af frøene før udsåning for bestemmelse af antagonisternes overlevelse.

Forsøget havde til formål

1. at undersøge forskelle i effekten af antagonister når de tilføres frøet som "post-coatning", dvs. efter stratificering eller "pre-coatning" dvs. i forbindelse med opstart af stratificering
2. at sammenligne inkubering ved 15°C i 3 dage før stratificering ved 3°C med direkte stratificering ved 3°C

6.1.1 Materialer og metoder

Inokulum blev produceret i sphagnum/ klid/ vand, nedtørret og findelt jfr. metodik kapitel 4. Fastlægning af smitteniveau skete med afsæt i den klassiske dosis respons-kurve der var konstateret i smitteforsøget kapitel 4. I forsøget anvendtes 0,5 % smitstof.

Dag 1

Udførtes støbsætning/antagonistbehandling (pre-coatning). Start-vægt (samlet) + start-vandindhold blev registreret for frøene.

Alle frøene blev skyllet i rindende vand i 3 timer i netpose i balje, derefter hældt over i en sigte og skyllet i 1 minut. Efter afdrypning og aftørring med

klæde, blev frøene vejet igen og vandindholdet beregnet på basis af start-vægt og start-vandindhold. Frø pr. behandling blev afvejet og 'target'-vægt ved 33 % vandindhold beregnet.

Følgende behandlinger indgik her:

1. ***Trichoderma harzianum*** TRI 003: 3 dage ved 15°C og derefter flyttet til 3°C
2. TRI 003 – som 1 men direkte ved 3° C
3. ***Clonostachys rosea*** IK726 : 3 dage ved 15°C og derefter flyttet til 3°C
4. IK 726 – som 3 men direkte ved 3° C
5. mælkesyrebakterier i eget substrat – placeret 3 dage ved 15° C og derefter flyttet til 3° C
6. mælkesyrebakterier nedcentrifugeret – 3 dage ved 15°C og derefter flyttet til 3° C
7. vand - 3 dage ved 15°C og derefter flyttet til 3° C (Kontrol)
- 8.-12. Direkte ved 3° C

Mængde af svampeantagonisterne tilført og overlevelsen på frøene umiddelbar efter coatingen (målt for behandling 1-2 og 3-4) fremgår af tabel 6.1

Bakterier: behandling 5 og 6 henholdsvis 80 ml bakterier i mediet og bakterier i vand rystet 10 minutter.

Vand: frø i behandling 8-12 rystet i 240 ml vand i 10 minutter. Resten jfr. proceduren ovenfor.

Dag 2

Fra alle prøver blev udtaget 5 frø til pladespredning (frø opbevaret ved 5° natten over i Petri skåle).

Dag 6

Vandindholdbestemmelser for alle behandlingerne, og hvis nødvendigt, blev vandindholdet justeret. (Frøenes nye vægt + vandindhold blev brugt til at beregne 'target-vægt').

Uge 6

Frøene blev lagt ud til forspiring (vådt filterpapir 15° C).

Uge 7

Frøene blev flyttet til 5° C for at bremse spiringen.

Uge 8

Uspirede frø blev sorteret fra i alle behandlinger. Fra ubehandlede frø (behandling 8-12) blev der udtaget frø til post-coating som følger:

8. 726 ler 0.2 i 20 ml (2×10^9 cfu pr. g)
9. 726 sph/klid 0.5g i 20 ml (9×10^8 cfu pr. g)
10. 726 siet sph/ klid (som ovenfor)
11. ubehandlet
12. ubehandlet (usmittet)

Der blev udsået 7 forspirede frø pr. potte x 5 gentagelser, alle smittet med 0,5 % ***Pythium ultimum*** var ***ultimum*** IK1983 (0,1 g til 25 g sphagnum/sand) (bortset fra behandling 12).

Fremspirede raske og fremspirede døde blev registreret efter 7, 14, 21 og 26 dage.

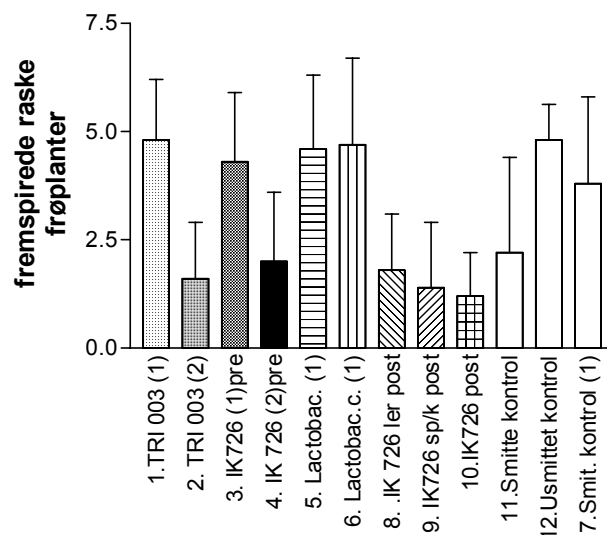
Resultater blev behandlet statistisk med SAS Proc glm procedure hvor Bonferroni (Dunn) t test blev anvendt for sammenligning af behandlingerne.

Tabel 6.1: Dosis af antagonist i præparater og genfund på frø efter coating

Behandling	Dosis anvendt X 10 ⁶ pr g frø	Dosis genfundet på frø efter coating X 10 ⁶ pr g frø
1. TRI 003, 3 d v. 15°C	3.4	1.1
2. TRI 003, 3°C	3.4	1.1
3. IK726, 3 d v. 15°C	18.6	0.1
4. IK726, 3°C	18.6	0.1
8. IK 726 ler post	114	-
9. IK 726 sph/klid post	157	-
10 IK 726 siet post	<157	-

6.1.2 Resultat

Af figur 6.1 fremgår antal raske fremspirede 26 dage efter udsåningen. Der er stor variation på fremspiring indenfor behandlingerne. Resultaterne viste at IK726 og TRI 003 pre-behandlet og direkte på køl (behandling 2 og 4) samt alle tre post-behandlede med IK726 (beh. 8,9 og 10) var statistisk lavere end usmittet kontrol, men ikke statistisk forskellig fra smittet kontrol (beh. 7 og 11). Endvidere var TRI 003 inkuberet 3 dage ved 15°C (beh. 1) statistisk bedre end tilsvarende behandling stillet direkte på køl (beh. 2) (alle vist ved p <0.05 niveauet ved Bonferroni (Dunn test)). Der var en generel tendens, men dog ikke underbygget statistisk, til at pre-coating af frø kan være fordelagtig.



Figur. 6.1. Behandlinger mærket (1) er inkuberet i 3 dage ved 15°C før de blev flyttet til stratificering ved 3°C. Behandlinger mærket (2) blev stillet direkte til stratificering. (Øvrige benævnelser vedrørende behandlinger se rapporttekst).

6.2 Parallelforsøg til markforsøg 2003 i potter inokuleret med *Pythium ultimum* var *ultimum*

I 2003 blev der udført markforsøg med antagonister, der havde vist størst effekt i første års markforsøg. Dette markforsøg blev sammenholdt med et smitteforsøg i væksthuse, hvori indgik de behandlede frø til markforsøget, men udsået i potter med tilsat smitte af *Pythium ultimum* var *ultimum* 1983. En forbehandling (pre-coatning) og en efterbehandling (post-coatning) med antagonister i forhold til stratificeringen blev sammenlignet.

6.2.1 Materiale og metoder

Frøparti 031/02 F526 Tversted testet med 65 % spiring (se kapitel 2) Metodik ved coatning og antal af cfu ved coatning, og udsåning henvises til kapitel 7. Frø behandlet til markforsøget blev udtaget og sået i potter kunstigt inokulerede med *Pythium ultimum* var *ultimum* isolat 1983. Inokulum blev produceret i sphagnum/ klid/ vand, nedtørret og findelt jfr. metodik kapitel 4 og tilsat 0,4 % i blandet det øvre jordlag.

Potteforsøg blev opstillet som markforsøg bortset fra at behandlingerne 1-9 blev tilsat smitte af *Pythium*, derfor en ekstra behandling 10 (der var opstillet med samme frø som for behandling 9) uden smitte.

1. TRI 003 (*T. harzianum*) precoatn.
2. IK 726 (*C. rosea*) precoatn ler
3. IK726 precoatn. Sphagnum/klid
4. TRI 003 postcoatn.
5. IK 726 postcoatn. ler
6. IK726 postcoatn. sph/ klid
7. Supresivit (*T. harzianum*) postcoatn.
8. Ubehandlet (ler precoatn.)
9. Ubehandlet
10. Ubehandlet og usmittet

200 frø pr. behandling blev udsået med 8 frø pr. potte i 25 potter. Substrat: Som tidligere anvendes sphagnum blandet med sand i forholdet 4:1. Til behandling 1-9, ialt 225 potter, blev tilsat 0,1g inokulum blandet i 25g sphagnum sand pr. potte. Al inokulum blev lagt over frøene efter udsåning.

Potterne blev tilset med vanding i 7 uger og planterne talt ugentlig, med første tælling 14 dage efter udsåning. Resultater blev behandlet statistisk med SAS Proc glm procedure hvor Bonferroni (Dunn) t test blev anvendt for sammenligning af behandlingerne.

6.2.2 Resultater

Resultater af tællingerne ses i tabel 6.1.

Der blev fundet statistisk højere fremspiring i forhold til den smittede kontrol af TRI 003 pre-behandling (beh. 1) ved første tælling efter 14 dage og TRI 003 pre-behandling (beh. 1) og *C. rosea* IK726 prebehandlet med ler (beh. 2) efter 2. tælling efter 3 uger. Ved øvrige tællinger var der ikke tale om statistisk effekt, men pre-coatning med antagonister (behandling 1, 2 og 3) lå i de fem første uger på ca. dobbelt plantetal i forhold til kontrollen og for behandlingerne 1 og 2 holdt tendensen gennem hele optællingsperioden. Coatning efter stratificeringen viste ingen positiv effekt. Fig. 6.2. viser udviklingen grafisk på tre opgørelsestids-punkter.

6.3 Diskussion og Konklusion

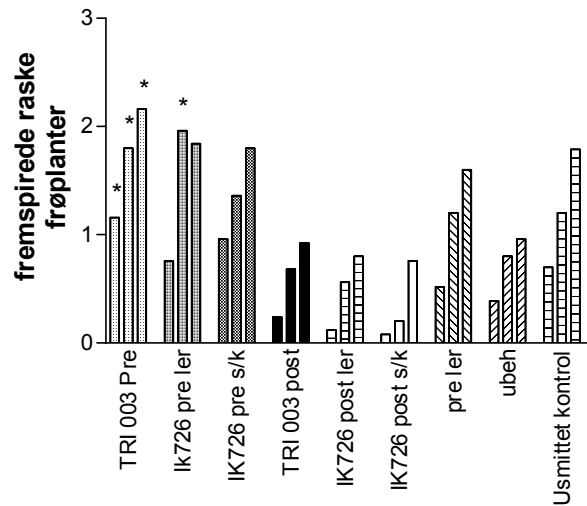
I forsøget beskrevet i 5.1 blev der fundet at frøpartiet 015/00 - der var testet egnet og anvendt i markforsøget 2002 - i 2003 havde en meget dårlig fremspiring. Antal forspirede frø, der kunne udsås i forsøget var således kun ca. 10 %. I overensstemmelse med dette er *A. nordmanniana* kendt for kun at kunne lagres i forholdsvis kort tid. Frøene kan derfor have været lavvitale og coatingen med antagonist dermed resultere i kritisk øget konkurrence om ilten efter udsåningen. Det er velkendt fra arbejdet med biologiske frøbehandlinger, at frøvitaliteten skal være god (selvom der godt kan være tale om et meget patogen- inficeret frøparti). Resultatet medførte valg (test) af nye frøpartier (se kapitel 2.1.) til de videre forsøg.

Når vi i ovenstående forsøg ser en bedre fremspiring af frø inkuberet ved 15° C i 3 dage (se behandlinger mærket (1) fig. 6.1) efterfulgt af almindelig stratificering end for de direkte stratificerede (2) kan dette måske skyldes de fysiologiske ændringer af frøet, idet også vandbehandlingen (7) havde statistisk tilsvarende højt gennemsnit. Metoden med få døgn inkubering ved højere temperatur benyttes ved de følgende års markforsøg (2003 og 2004)

Tabel 6.1. Gennemsnit af fremspirede raske Abies planter pr potte i parallelforsøg til markforsøg opsat i 25 gentagelser ved 15° C. Der er udsået 8 frø pr. potte. Behandling nr. 1-9 tilført *Pythium ultimum* var ultimum IK 1983. Resultater opgjort fra d. 21. 5 (14 dage efter såning) og indtil 7 uger efter såning.

No	Behandling	14 dage	3 uger	4 uger	5 uger	6 uger	7 uger
1	TRI 003 pre	1.16 A ¹	1.8 AB	2.12 A	2.16 A	1.96 A	2.12 A
2	IK 726 pre-ler	0.76 ABC	1.96 A	2.0 AB	1.84 AB	2.12 A	1.96 A
3	IK 726 pre s/k	0.96 AB	1.36 ABC	1.4 ABC	1.8 AB	1.36 AB	1.4 AB
4	TRI 003 post	0.24 CD	0.68 C	0.96 BCDE	0.92 BCD	1.0 AB	1.04 AB
5	IK726 post-ler	0.12 D	0.56 C	0.52 CDE	0.8 BC	0.8 B	0.88 B
6	IK 726 post-s/k	0.08 D	0.2 E	0.28 E	0.76 BC	0.76 B	0.68 B
7	Supresivit	0.24 CD	0.92 BC	1.2 ABCDEFG	1.2 ABCD	1.04 AB	1.12 AB
8	Pre-ler	0.52 BCD	1.2 ABCD	1.6 ABCDEF	1.6 ABCD	1.36 AB	1.28 AB
9	Ubehandlet	0.39 BCD	0.8 CDE	1.08 ABCDEFG	0.96 ABCD	1.36 AB	1.28 AB
10	Ubeh/usmittet	0.7 ABCD	1.2 ABCD	1.79 ABCDEFG	2.04 ABCD	2.08 A	1.84 A

¹gennemsnit efterfulgt af forskelligt bogstav statistisk forskellig i henhold til Bonferroni (Dunn) t test ved p=0.05



Figur 6.2. Raske, spirede *Abies* kimplanter pr. potte i smitteforsøg drivhus. (potter inokuleret med *Pythium ultimum* var *ultimum* 1893). Parallelforsøg til markforsøg 2003. 1. søjle talt efter 14 dage, 2. søjle efter 3 uger og 3. søjle efter 5 uger. * markerer behandlinger statistisk forskellige fra ubehandlet kontrol i henhold til Bonferroni (Dunn) t test ved $p=0.05$

I parallelforsøg til markforsøget med frøparti 031 testet 2003 (1 år efter høst af frøpartiet) sås der en overordnet god effekt af behandlinger før stratificering. Antallet af fremspirede planter var statistisk højere i behandling med lerformuleret *C. rosea* IK726 og *T. harzianum* TRI 003 i forhold til lerbehandling alene. Der må således konkluderes, at der ved kort fremspiringsperiode og højt sygdomstryk af *P. ultimum* kunne vises en effekt af antagonistbehandlinger påført før stratificering.

7 Bekæmpelse af sygdomme på *Abies nordmanniana* frøplanter ved hjælp af antagonistiske mikroorganismer under markforhold

Med henblik på at undersøge muligheder for at anvende mikroorganismer som alternativ til kemiske behandlinger i planteskolerne blev der foretaget tre års markforsøg med antagonister

1. år: Forsøg til udvælgelse af potentiel antagonist
2. år: Forsøg med bedste antagonister, optimeret udbringning
3. år: Sammenlignende forsøg: antagonist, frømateriale og stratificeringslængdes betydning for fremspiring og sundhed af *Abies nordmanniana* frøplanter

Forsøg med formuleringer af IK726 (kapitel 5) dannede grundlag for valg af 2 forskellige formuleringer: spagnum/klid og lerformulering af IK726 til andet års markforsøg.

Forsøg med stratificeringslængder og coatninger (kapitel 3) dannede grundlag for valg af frøpartier, stratificeringslængder i det tredje års markforsøg.

Parceller der indgik i de tre års markforsøg blev undersøgt for tilstedeværelse af potentielle patogene svampe ved jordprøvetagning i forsøgsarealerne og efterfølgende pladespredninger og "baitings"-forsøg. Herved blev det belyst at *Pythium* og *Fusarium* svampe spiller den største rolle i forsøgsarealet (se kapitel 2) og at smittetrykket i de tre års forsøg kunne anses for at være på samme høje niveau. Dette resultat gjorde det muligt at anlægge samme strategi for bekæmpelse i de tre år, samt at forskyde forsøgsarealet. Det sidste var nødvendigt for at undgå restkoncentrationer af mikroorganismer i jorden, der var anvendt til frøcoatning det foregående år.

7.1 Materiale og metoder

Der udførtes 3 markforsøg i naturligt inficerede forsøgsparceller i Fosdal Planteskole. Forsøgene lå på to tætliggende marker på hver ca. 6 ha. pH i forsøgsarealet blev målt til 5.5 og 5.7. Sædskiftet udgøres af 2 års skovfrøplanter og 2 års kløvergræs/rajgræs i skifte.

Forsøgsdesign var et randomiseret blokforsøg med 4 gentagelser (5 gentagelser i det tredje forsøg (2004)). Frøbed forberedtes med bedformer. Hver blok var karakteriseret ved en 1 m bred længdegående bed-række, hvor hver parcel var 5 m lang. Mellem hver parcel i blokken lå en 50 cm værnerække, hvor der ikke var udsæet frø. Mellem blokkene lå et 50 cm kørespor (fig 7.1). Sætethed var 2000 frø per m², der er den almindelig anvendte i planteskoler. Efter såning blev frøene dækket med vasket sand.

Detaljer omkring de kommercielle anvendte antagonist, doseringer og overlevelse ved udsåning i de 3 års markforsøg fremgår af tabel 7.1. Doseringerne blev fastlagt i henhold til de angivelser der var til rådighed på etiketter eller baseret på forsøg. Angivelserne var dog alle baseret på andre frøtyper. Den endelige dosering blev så yderligere justeret i forhold til antallet af spiredygtige enheder (cfu) i de forskellige produkter og formuleringer. Frøene blev opslemmet i vandige opløsninger af antagonistene. Coatningen foregik i plasticposer ved skiftende bevægelser i 2 minutter. Efter coatningen blev vandindholdet bestemt og frøene blev holdt ved 33% m.c. indtil udsåning, enten ved tilsætning af vand eller ved svag tørring. Efter coatningen henstod frøene ved ca. 15°C i 1-2 døgn før de blev sat til stratificering ved 3°C. Overlevelsen af svampe på frøene blev evalueret ved pladespredninger af 3 x 5 frø pr. behandling pr. udtagnings-tidspunkt.



Figur 7.1 Markforsøg Fosdal 2003

7.1.1 Forsøgsdesign

1.år: Markscreening

Frøparti: Tversted 015/2000. Frøpartiet var analyseret for lavt mht forekomst af patogene svampe (*Fusarium* og *Cylindrocarpus*: hhv 0,25% og 1%) og spiringen 60% i laboratorietests (kapitel 2).

Alle frøbehandlinger blev foretaget umiddelbart før såning:

1. Supresivit (*T. harzianum*)
2. IK 726 (*C. rosea*)
3. FZB (*Bacillus subtilis*)
4. TRI 003 (*T. harzianum*)
5. Vand - kontrol

Frøene blev sået d. 23. maj 2002; første markopgørelse var d. 18. juni og anden opgørelse d. 4. juli.

2. år: Test af selekterede antagonist påført sammen med stratificering (pre-) eller efter stratificeringen (post-)

Frø parti var 031/2002 F526 Tversted. Det var lavt inficeret med patogener (*Fusarium* og *Cylindrocarpus*: hhv 0,8% og 0,2%) og spiringen blev opgjort til 65% (se kapitel 2).

Formulering med *C. rosea* IK726 var enten som ler eller sphagnum klid inokulum.

1. TRI 003 precoatning
2. IK726 precoating - ler
3. IK726 precoating. Spagnum/klid
4. TRI 003 postcoating
5. IK726 postcoating ler
6. IK726 postcoating sphagnum/klid
7. Supresivit postcoating
8. Kontrol – coatet med ler
9. Ubehandlet kontrol

Stratificeringen startede d. 7. april 2003; behandling 1, 2, 3 og 8: d. 10. april, behandling 4, 5, 6, 7 og 9 d. 5. maj og såning d. 6. maj. Den første opgørelse i marken skete d. 20. maj, og den anden d. 16. juni 2003

3. år: Test af selekterede antagonister på vitale og lavvitale frø, ved to stratificeringslængder.

Frøparti 031/02 og 028/01 Ambrolauri, Tlugi Georgien. I 2004 sås partiet 031 at have en dårligere fremspiring end i 2003, medens 028 havde bedre vitalitet. Antagonistbehandling og stratificeringslængder resulterede i forskellige effekter for de to frøpartier udsået i neutralt vækstsstrat (kapitel 3). I markforsøget ønskedes det belyst om stratificeringslængde og frøkvalitet kan indvirke på antagonisteffekten under markforhold. Følgende behandlinger blev foretaget:

- 031/02, stratificeret 3 uger + IK 726
- 031/02, stratificeret 3 uger, kontrol
- 031/02, stratificeret 6 uger + IK 726
- 031/02, stratificeret 6 uger, kontrol
- 028/01, stratificeret 3 uger + IK 726
- 028/01, stratificeret 3 uger, kontrol
- 028/01, stratificeret 6 uger + IK 726
- 028/01, stratificeret 6 uger kontrol

Såning d. 11. maj 2004; opgørelser hhv. d. 9. juni og d. 9. juli

7.1.2 Opgørelse i marken

Opgørelse af fremspiring i marken og indsamling af planter for bestemmelse af post-emergence symptomer foregik ved udlægning af 30 x 30 cm ramme med træde i net pr. 10 cm. Rammen blev udlagt 6 gange i første prøveoptælling (8 gange i sidste optælling) efter fastlagt mønster med 15 cm mellem rammerne og skråt over parcellen rykket 10 cm hver gang. Planter i ruderne i diagonalerne blev optaget til bestemmelse af angrebsgrad (dvs. ca 180 planter pr. parcel ved gennemsnitligt angreb). Første opgørelse skete omkring 20-30% fremspiring og sidste opgørelse, efter fuld spiring.

Planterne blev vasket og undersøgt med lup for sygdomssymptomer. Planterne blev sorteret efter 1. Post-emergence symptomer eller deformede planter, og 2. Raske planter.

Der blev indhentet klimadata fra DMI via www.dmi.dk

7.1.3 Statistiske analyser

Den gennemsnitlige fremspiring i markforsøg med randomiseret blok design var kontinuert variable størrelser (tabel 2 to 4). Denne variabel blev analyseret ved variansanalyse. I 2004 eksperimentet blev der desuden analyseret ved sortering efter faktor i 3-faktor forsøget. Spørgsmålet om syge eller raske planter, der indgik i alle 3 forsøg er en diskret variabel, hvor der spørges om en begivenhed (sygdom) finder sted eller ej. Derfor analyseres data med logistisk regression. (Collett, 1991). For sammenligning af diskrete variable (procent) blev odds ratio udregnet med vandkontrol som reference. Denne er udtrykt ved odds for at finde en syg i en behandling i forhold til sandsynligheden for at finde en syg i kontrolbehandlingen. Når odds ($p/[p-1]$ hvor p er muligheden for at finde en syg plante) f.eks er 0.48 for en givet behandling vil det sige at sandsynligheden for at finde en syg plante kun er halvt så stor som i kontrollen. For både kontinuerte og diskrete variable blev hypotesen forkastet når $P < 0.05$. Alle data blev analyseret ved PC-SAS 8 udgave 6.11; SAS Institute, Cary, NC.

7.2 Resultater

Mark forsøget 2002 (se tabel 7.2) viste ved første registrering i marken (d. 21.5) højest fremspiring af behandling 4 (*Trichoderma harzianum* TRI 003) og lavest af behandling 3 (*Bacillus subtilis*) (fulgt af kontrollen) ($p = 0.01$). Ved anden opgørelse var der ingen forskel på antal af fremspirede frøplanter mellem behandlingerne, (d. 5.7.02) der var ingen statistisk forskel mellem behandlinger ($p > 0.05$) hverken for fremspiring eller frekvens syge/raske. Der var dog samme tendens: behandling 3 (*Bacillus subtilis*) lå numerisk lavest ved antal fremspirede (fulgt af kontrollen) medens behandling 4 (*Trichoderma harzianum* TRI 003) lå højest. En vandlidende parcel havde lavest fremspiring og højest angreb. Ubehandlede havde den højeste frekvens af syge planter, men dette var ikke statistisk signifikant i forhold til odds-ratio modellen (tabel 7.2).

I mark forsøget 2003 blev der foretaget en sammenligning af levedygtige spiringsenheder af de tre formuleringer af antagonistene: a) *C. rosea* IK726 ler, b) *C. rosea* sphagnum/klid, c) TRI 003, på såtidspunktet. Disse blev sammenlignet med behandlinger foretaget efter stratificeringen (tabel 7.1). Resultaterne viste at spiringsenhederne af svampene var faldet med 30 %, 6 % and 98 % henholdsvis, for de tre formuleringer.

Ved første marktælling blev der observeret stående vand imellem parceller i den østligste del af forsøget. I den statistiske analyse af forsøgsdata blev der derfor valgt 2 metoder, én for alle parceller (tabel 7.3A) og én hvor vandlidende parceller er udtaget af beregningerne (7.3B). Af tabellerne fremgår at der var effekt på fremspiring af alle pre-coatninger før stratificering - inklusive lerbehandling alene, når vi ser på den første tælling i marken. Ved den anden tælling var der kun signifikant bedre fremspiring af behandling 2 (IK726 ler behandlet før stratificering) i forhold til kontrollen, og kun når man ser på statistikken, hvor de vandlidende parceller er frataget. Der var ingen signifikant forskel på frekvensen af syge planter for de forskellige behandlinger. (Tabel 7.3). Der var ikke signifikant forskel på frekvensen af syge/raske.

I markforsøget 2004 var der ved første opgørelse 4 uger efter såning et meget lavt fremspiringstal (resultat for total tælling for 6 rammer tabel 7.4) på grund af en meget kold forsommer (tabel 7.5). Det ses dog en klar tendens til en

øget fremspiring for beh. 7 og 8 for frøparti 28, 6 ugers stratificering. Efter 2 måneder ses en signifikant øget fremspiring af frøparti 28 og antagonistbehandling ved 3 ugers forbehandling af dette parti i forhold til 3 uger uden antagonisten. Hvis man bruger en analysemodel for 3 faktorforsøg og analyserer data sorteret efter forbehandlingsslængde ses en generel signifikant ($p=0.0111$) effekt af antagonistbehandling ved 3 ugers forbehandling og af anvendelse af frøparti 28 ved begge forbehandlingsslængder (<0.0001). Hvis data sorteres efter frøparti ses en signifikant effekt af frøbehandlingsslængde for frøparti 28 ($p<0.0001$) og for antagonistbehandling for frøparti 28 ($p=0,0099$) og signifikant men på et lavere niveau af antagonistbehandling for parti 31 ($p=0,0481$).

De optagne planter blev vasket og inspiceret med lup for angreb. Der blev, ligesom i 2002, skelnet mellem planter med rødbrand, planter med deform fremspiring og sunde planter. Der var et signifikant højere sygdomsniveau i frøparti 31 sammenlignet med parti 28. (<0.0001) (tabel 7.4). I alle forsøgene blev der overvejende isoleret *Fusarium oxysporum/redolens* fra post-emergence visne og stikprøver fra pre-emergence syge frøplanter viste hovedsagelig *Pythium* spp. Der blev ikke isoleret *Papulaspora immersa* fra planterne.

Klimadata for Thy, i de tre forsøgsperioder ses i tabel 7.5. Sæsonen 2002 var gennemsnitlig for temperatur og nedbørsmængden lav til middel i det tidlige forår. Der var overskud i nedbør i foråret 2003 (april/maj) mens nedbørsmængde og temperatur var lav i forsøgssæsonen 2004. Især var temperaturen under gennemsnittet for juni.

7.3 Diskussion og konklusion

Resultaterne af markforsøgene viste en klar tendens til at hastigheden for spiring øges med TRI 003 og IK726 behandling, idet der ved første tælling ses en øget fremspiring i flere forsøg. Endvidere ses der i forsøgene en overordnet god effekt af behandlinger før stratificering, medens coatning efter stratificering må anses at være af variabel effekt, men oftest uden virkning. Det kan samlet konkluderes, at der var et højt plantetal, hvor fremspiringsperiode i marken var kort, enten dette skyldes brug af antagonister (eller ler), der øger fremspiringshastigheden, et vitalt frøparti, eller gunstige fremspiringsforhold i marken. Set i lyset af resultater der er opnået i kontrollerede smitteforsøg og bekæmpelse af frøbårne patogener med antagonister synes der at være perspektiver for anvendelse af antagonisterne *Clonostachys rosea* IK726 og *Trichoderma harzianum* TRI 003 i formuleringer på frø før stratificeringen.

Præparatet FZB (*Bacillus subtilis*) viste negativ effekt på fremspiringen i forsøget hvor dette præparat indgik (markforsøget 2002). Dette kan skyldes at *Rhizoctonia* spp. synes at spille en mindre rolle som jordbåren patogen i forsøgsarealet (se kapitel 2), idet præparatet er kendt for at være virksom mod sygdomme forårsaget af denne svampegruppe (Wicks et al. 1995). Overlevelsen på frø kan imidlertid også være en faktor, da genfinding ikke blev undersøgt på grund af sammenflydning af kolonier på almindelig dyrkningssubstrater.

Tabel 7.1. Produkters oprindelse og aktuel mængde af spiredygtige enheder (cfu) samt dosering og aktuel mængde af (cfu) på frøene ved udsåningen for de tre markforsøg I 2002, 2003 og 2004. Post strat. = Tilført efter stratificering og Pre strat. = tilført før stratificering

Markforsøg udført år	Behandling nr.	Produkt / Isolat formulering	Aktive ingredient og indhold af cfu jfr. deklaration(mærket *) eller bestemmelse ved pladespredning før brug	Mængde tilført per cfu pr g frø ved g frø og tidspunkt/såning for coatning		Oprindelse af præparatet
2002	1	Supresivit™	<i>Trichoderma harzianum</i> 3,9 x 10 ⁹	0.002 g Post-strat.	6.6 x 10 ⁶	Fytovita, Czech Republic
	2	IK 726 ?	<i>Clonostachys rosea</i> 3 x 10 ⁸	0.005 g Post-strat.	7.9 x 10 ⁵	Knudsen et al. (1997)
	3	FZB24WG™	<i>Bacillus subtilis</i> >5 x 10 ¹⁰ *	0.0003 Post-strat.		Biotechnik GmbH Berlin, Germany
	4	TRI 003	<i>T. harzianum</i> 8.9 x 10 ⁷	0.005 Post-strat.	1.3 x 10 ⁶	GroWell Hydroponics & Plant Lighting Ltd
2003	1	TRI 003	<i>T. harzianum</i> 6 x 10 ⁷	0.006g Pre-strat.	4.2 x 10 ⁵	GroWell Hydroponics & Plant Lighting Ltd
	2	IK 726, clay	<i>C. rosea</i> 4 x 10 ⁹	0.005g Pre-strat.	6.1 x 10 ⁶	Knudsen et al. (1997)
	3	IK 725, peat/bran	<i>C. rosea</i> 9 x 10 ⁸	0.011 g Pre-strat	1.9 x 10 ⁶	Knudsen et al. (1997)
	4	TRI 003	<i>T. harzianum</i> 6 x 10 ⁷	0.006g Post-strat.	2.3 x 10 ⁶	GroWell Hydroponics & Plant Lighting Ltd
	5	IK 726, clay	<i>C. rosea</i> 4 x 10 ⁹	0.005g Post-strat.	9.9 x 10 ⁶	Knudsen et al. (1997)
	6	IK725, peat/bran	<i>C. rosea</i> 9 x 10 ⁸	0.011 g Post-strat	1.8 x 10 ⁶	Knudsen et al. (1997)
	7	Supresivit	<i>T. harzianum</i> 2,4 x 10 ¹⁰	0.015 g Post-strat.	6.6 x 10 ⁶	Fytovita
2004	1+3+5+7	IK726, clay	<i>C. rosea</i> 4 x 10 ⁹	0.005 g	2.6 x 10 ⁶	Knudsen et al. (1997)

Tabel 7.2 Resultater fra markforsøg 2002 med antagonist. Spiring opgjort 4 uger efter udsåning (d. 21.5.) ved tællinger i 6 rammer á 9 kvadrater á (10 x 10) pr. parcel og 5½ uger efter udsåning (d. 5.7) ved tællinger i 8 rammer á 9 kvadrater á (10 x 10) cm²pr. parcel. Sygdomme på kimplanter undersøgt ved optagning af planter d. 5.7 i 8 rammer á 3 diagonale kvadrater á (10 x 10) cm² pr. parcel.

Behandling	Fremspiring/ Ramme 21.5.02 gennemsnit	Fremspiring/ Ramme 5.7.02 gennemsnit ¹	%syge ²	% raske	Odds/ratio ³
1. Supresivit	36,9 AB	67,2	23,5	76,5	0,63 ^{n.s.}
2. IK726	36,0 AB	64,7	22,1	77,9	0,56 ^{n.s.}
3. FZB	28,4 C	58,8	21,3	78,7	0,47 ^{n.s.}
4. TRI 003	42,1 A	69,0	22,7	77,3	0,58 ^{n.s.}
5. Ubehandlet	35,0 B	63,9	34,4	65,6	1,00
P-værdi	0,0100	0,1219	-	-	-
LSD-værdi	6,5	n.s.	-	-	-

¹analysemodel: Variansanalyse; Proc glm. Data efterfulgt af forskelligt bogstav statistisk forskellig jfr. T test for variable

²%syge: angiver frøplanter med rodbrandsymptomer eller deform spiring af samlede optagne

³analysemodel: Logistisk regressionsanalyse; Proc genmod

Tabel 7.3 A Resultater fra markforsøg 2003 med antagonist. Spiring opgjort 14 dage efter udsåning (d. 20.5.) og 6 uger efter udsåning (d. 16.6) ved tællinger i 6 rammer á 9 kvadrater á (10 x 10) cm²pr. parcel. Sygdomme på kimplanter undersøgt ved optagning af planter d. 16.6 i 6 rammer á 3 diagonale kvadrater á (10 x 10)cm² pr. parcel.
a. Analyse foretaget på alle tælletal

Behandling	Fremspiring/ Ramme 20.5.03 gennemsnit	Fremspiring/ Ramme 16.06.03 gennemsnit ¹	%syge ²	% raske	Odds/ratio ³
1. TRI 003 pre-	41,5 A	65.8 A	70	30	2.6 n.s
2. IK726/ler-pre	31.5 BC	79.2 A	37	63	0.48 -
3. IK 726/sp-klid pre	35.9 BC	66.1 A	30	70	0.57 -
4. TRI 003 post	21.7 D	68.0 A	45	55	0.57 -
5. Ik726/ler post	20.1 D	67.9 A	37	63	0.58 -
6. IK726/sp-klid post	14.7 D	67.3 A	45	55	0.6 -
7. Supresivit post	23.1 DE	71.3 A	45	55	0.94 -
8. Ubehandlet ler pre	32.9 AB	86.5 A	19	81	0.22 -
9. Ubehandlet	17.7 D	73.0 A	46	54	1.0
P-værdi	0,0100	0,4643	0,4187	-	-

¹analysemodel: Variansanalyse; Proc glm. Data efterfulgt af forskelligt bogstav statistisk forskellig jfr. T test for variable

²%syge: angiver frøplanter med rodbrandsymptomer eller deform spiring af samlede optagne

³analysemodel: Logistisk regressionsanalyse; Proc genmod

Tabel 7.3 b. Analyse foretaget på tællel af rammer i ikke-vandlidende parceller

Behandling	Fremspiring/ Ramme 20.5.03 gennemsnit	Fremspiring/ Ramme 16.06.03 gennemsnit ¹	%syge ²	% raske	Odds/ratio ³	
1. TRI 003 pre-	42.1 A	73.4 BCD	51	49	1.85	n.s
2. IK726/ler-pre	37.5 A	92.4 A	17	83	0.53	-
3. IK 726/sp-klid pre	39.3 A	76.1 ABCD	33	67	1.04	-
4. TRI 003 post	21.7 CD	57.7 ABCD	30	70	0.58	-
5. IK726/ler post	15.3 CD	67.9 CD	37	63	0.98	-
6. IK726/sp-klid post	14.7 D	67.3 CD	30	70	0.64	-
7. Supresivit post	24.7 B	76 ABCD	24	76	0.90	-
8. Ubehandlet ler pre	32.9 A	86.5 AB	19	81	0.36	-
9. Ubehandlet	17.7 BCD	76.1 BCD	36	64	1.0	
P-værdi	<0,0001	0.0390	0.8403			

¹analysemodel: Variansanalyse; Proc glm. Data efterfulgt af forskelligt bogstav statistisk forskellig jfr. T test for variable

²%syge: angiver frøplanter med rodbrandsymptomer eller deform spiring af samlede optagne

³analysemodel: Logistisk regressionsanalyse; Proc genmod

Tabel 7.4 Resultater fra markforsøg med antagonist 2004. Spiring opgjort 4 uger efter udsåning (d. 9.6.) og ca. 2 måneder efter udsåning (d. 8.7) ved tællinger i hhv. 6 og 8 rammer á 9 kvadrater á (10 x 10) cm² pr. parcel.

Behandling	Fremspiring/ Total for 6 rammer 9.6.04	Fremspiring/ Ramme 8.7.04 gennemsnit ¹	%syge ²	% raske	Odds/ratio	
1. 031, 3 uger IK726	2,8	15,2 D	58	42	5.7	***
2. 031, 3 uger, Kontrol	1,8	10,6 D	69	31	8.0	-***
3. 031, 6 uger IK726	14,6	12,7 D	65	35	7.3	***
4. 031, 6 uger	13,2	12,1 D	53	47	4.6	***
5. 028, 3 uger IK726	8,2	61,1 B	23	77	1.0	n.s.
6. 028, 3 uger	4	46,9 C	26	74	1.27	*
7. 028, 6 uger IK726	30,8	79,1 A	19	81	0.9	n.s.
8 028, 6 uger	32,6	72,4 A	22	78	1.0	n.s.
P-værdi		<0.0001	0.4187			

¹analysemodel: Variansanalyse; Proc glm. Data efterfulgt af forskelligt bogstav statistisk forskellig jfr. T test for variable

²%syge: angiver frøplanter med rodbrandsymptomer eller deform spiring af samlede optagne

³analysemodel: Logistisk regressionsanalyse; Proc genmod.

Tabel 7.5 Klimadata for Thy i forsøgsperioderne (kilde www.dmi.dk)

		April	Maj	Juni	Juli
2002	Temp °C	7.9	13.5	16.2	17.6
	Nedbør mm	23	50	97	123
2003	Temp °C	7.5	11.5	16.3	18.8
	Nedbør mm	81	78	94	102
2004	Temp °C	8.6	12.3	14.4	16.1
	Nedbør mm	37	44	43	83

8 Bekæmpelse af sygdomme på *Abies nordmanniana* frøplanter ved hjælp af ændrede dyrkningsforhold i marken

Med henblik på at undersøge om planteafstand og teksturændringer kunne fremme spiringen af frøplanter og/eller give bedre kvalitet af frøplanterne, blev der i 2002 parallelt med forsøg med antagonister, udført et markforsøg med ændrede såtætheder og teksturændring ved pålægning af sand.

8.1 Materialer og metoder

Forberedelse af forsøget skete i lighed med det beskrevne for markforsøg i 2002 i naturligt inficerede forsøgsparcer i Fosdal Planteskole. Frøbed forberedtes med bedformer som antagonistforsøg, men der blev i én behandling udlagt samme mængde sand i parcellen før udsåning, som der blev pålagt for alle parceller efter udsåning.

Forsøgsdesign:

1. Kontrol ubehandlet almindelig frømængde (2000 frø m²)
2. ubehandlet ½ frømængde
3. ubehandlet ¼ frømængde
4. sand udlagt under og over frø

Forsøget blev udlagt i 4 blokke (4 gentagelser). Såning blev foretaget 23 maj; første tælling d. 18. juni; anden tælling d. 4. juli.

Opgørelse af fremspiring i marken og indsamling af planter for bestemmelse af post-emergence symptomer foregik ved udlægning af 30 x 30 cm ramme med træde i net pr. 10 cm i lighed med forsøg beskrevet i kapitel 7. Imidlertid blev der på grund af lille fremspiring justeret for antallet af udlagte rammer (antal tællinger pr. parcel). Således blev der i behandling 2 udlagt 16 rammer og i behandling 3 og 4: 24 rammer.

Der blev optaget planter i diagonale ruder i alle rammer jfr. Kapitel 7. og optagne planter vaskedes og inspiceredes med lup for angreb.

8.2 Resultater

Tabel 2 og 3 viser resultatet af opgørelserne. I tabellen udgør syge planter: planter med rodbrand og deform spiring.

Fremspiringen fulgte nøje den givne såtæthed idet der var højst fremspiring ved højeste såtæthed ($p=0.0001$) (se tabel 3). Der var endvidere højere procent syge ved den laveste såtæthed (¼) i forhold til kontrollen ($p=$

0.0143). Der var ikke tale om en gunstig effekt ved udsåning i sand, derimod om en dårligere fremspiring ($p=0.0001$).

Tabel 8.1 Resultater fra markforsøg med såtæthed og tekstur. Spiring opgjort 4 uger efter udsåning (d. 21.5.) ved tællinger i 6 rammer á 9 kvadrater á (10 x 10) cm² pr. parcel og 5½ uger efter udsåning (d. 5.7.) ved tællinger i 8 rammer á 9 kvadrater á (10 x 10) cm² pr. parcel. Sygdomme på kimplanter undersøgt ved optagning af planter d. 5.7. i 8 rammer á 3 diagonale kvadrater á (10 x 10) cm² pr. parcel

Behandling	Fremspiring/ Ramme 21.5.02 gennemsnit	Fremspiring/ Ramme 5.7.02 gennemsnit ¹	%syge ²	% raske	Odds/ratio ³
1. alm såtæthed	29,0 A	49,9 A	16,8	83,2	1,00
2. ½ såtæthed	19,6 B	24,3 B	19,2	80,8	1,08 ^{n.s.}
3. ¼ såtæthed	8,6 C	11,9 C	24,3	75,7	1,46*
4. sand under frø	0,3 D	0,7 D	4,5	95,6	0,35 ^{n.s.}
P-værdi	0,0002	0,0001	-	-	-
LSD	5,0	7,0	-	-	-

¹analysemodel: Variansanalyse; Proc glm. Data efterfulgt af forskelligt bogstav statistisk forskellig jfr. T test for variable

²%syge: angiver frøplanter med rodbrandsymptomer eller deform spiring af samlede optagne

³analysemodel: Logistisk regressionsanalyse; Proc genmod

8.3 Diskussion og Konklusion

Det kan konkluderes at teorien at lavere såtæthed skulle medføre en procentvis bedre fremspiring og raskere planter ikke kunne eftervises. Endvidere havde tilførsel af sand før udsåning stor skadelig effekt for fremspiring.

Sygdomsudviklingen fremkaldt af *Pythium* svampe er kendt for at øges i vandlidende jord (Gillmann, 2001) og forsøgene kap. 7 viste også at der i vandlidende parceller var markant dårligere fremspiring. Derfor må det forventes at en bedre afdræning vil øge fremspiringen. Tilførsel af et sandlag før udsåning bevirkede imidlertid en udtørring af frøene, der resulterede i en markant lav fremspiring. Der skal hertil bemærkes at nedbørsmængden var forholdsvis lav i april/maj 2002 (se tabel 7.5) Hvis man med andre tiltag kan øge porøsiteten af jorden og afdræne jorden, må man forvente at noget af *Pythium* angrebet kan afhjælpes. Samtidig vil en sådan dræningseffekt også være gavnlig, hvis man samtidig anvender biologisk bekæmpelse jfr. kapitel 7.

9 Samlet diskussion og konklusion

I undersøgelsen blev det påvist at *Pythium* spp. og *Fusarium* spp. var involveret i pre- og post emergence udfald i *Abies nordmanniana* frøbedene i Fosdal planteskole. Dette er i overensstemmelse med de miljømæssige forhold, der var på forsøgstidspunktet, idet *Pythium* er kendt for at forårsage store sygdomsproblemer ved lave temperaturer (<12°C) når der samtidig er tale om våde til vandlidende jorde og manglende konkurrence fra andre mikroorganismer (Cram, 2003). I frøbedene var der generelt tale om høj vandmætning og i 2003 var der tale om længere tids stående vand i visse parceller.

Mængden af frøbårne patogener varierede på de testede frøpartier. Det højeste niveau blev fundet på frøparti 031/02, udtrykt ved antal syge fremspirede planter i 2004 registreret i vækstkammerforsøg, 2 år efter frøpartiet var høstet. Frøbårne *Fusarium oxysporum* og *Fusarium redolens* var involveret, men også svampen *Papulaspora immersa* blev isoleret fra sygt væv og det er sandsynliggjort at svampen kan forårsage sygdom når planten vokser i sterilt medium. Det er tidligere rapporteret at *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma* og *Papulaspora* var de svampe der hyppigst blev høstet på 111 frøpartier af *Abies* gennem nogle års undersøgelser i daværende Tjekkoslovakiet (Prochazkova, 1991). *Papulaspora* blev fundet i 41% af frøene, men blev ikke rapporteret patogen (Prochazkova, 1991). De opnåede resultater i markforsøget (kapitel 7) viste dog, at der ved isoleringer fra stikprøver af pre- og post emergence syge/døde planter i marken, kunne konkluderes at betydende patogener på frøplanter isoleret fra marken alle 3 år tilhørte *Pythium ultimum*, *Pythium* spp. og *Fusarium oxysporum/redolens*. Denne observation var også i overensstemmelse med lignende resultater opnået i forsøg i planteskoler (Larsen et al., 2004) hvor der fra planter fra marken ikke isoleredes *Papulaspora immersa* under markforhold. Derfor er der formodentlig tale om at svampen udkonkurreres under markbetingelser. Til gengæld kan *Fusarium* spp. udvikles under stratificeringen. Således er der eksempel på en øget infektionsprocent fra 25% før til 100% efter stratificeringen (Hoefnagels & Linderman, 1999)

Variationen i frøpartiers vitalitet og sundhedsstatus bør give grundlag for omhyggeligt valg af stratificeringslængder, antagonistbehandling og/eller anden frøteknologi. *Abies* frø er langt mere genetisk diverse end frø af forædlede landbrugsafgrøder, og de har i sammenligning med disse generelt en lavere fremspiring, der også skyldes tilstedeværelsen af tomme frø. Resultaterne der blev opnået i denne undersøgelse viste, at tilførsel af antagonister virkede forskelligt på partierne. Imidlertid viste tilførsel af antagonister umiddelbart efter imbiberingen - og således med mulighed for etablering under stratificeringen - generelt de bedste resultater. Dette gjaldt såvel det kommercielle produkt TRI 003 der er baseret på *Trichoderma harzianum*, som det nært kommercielle produkt *Clonostachys rosea* IK726. I en sammenlignende undersøgelse med forskellige formuleringer af IK726 blev der vist at anvendelse af den mest lagerfaste lerformulering (Jensen et al., 2000b) også var en god metode til at opnå effektiv bekæmpelse. Hoefnagels & Linderman (1999) fandt ligeledes at anvendelse af

antagonisten, *Pseudomonas chlororaphis* RD31-3A ved imbiberingen, kunne reducere udviklingen af *Fusarium* spp., men denne antagonist kunne ikke beskytte mod jordbærent smitte.

Påførsel af antagonister efter stratificeringen af *Abies nordmanniana* var en meget usikker metode, der i visse tilfælde viste sig at hæmme fremspiringen. Dette blev vist i smitteforsøg i pletter med lavvitalt frø, medens der i et enkelt markforsøg 2002 var en gunstig effekt af behandlingen. Tilgængeligt ilt for frøspiring er, alt andet lige, reduceret, når frø er naturligt koloniseret med eller coatede med respirerende mikroorganismer (Harper & Lynch, 1979; Ruegger et al. 1990). Dette giver normalt ikke anledning til problemer, idet der er en række eksempler på at frøbejdsning af landbrugs- og havebrugsafgrøder med antagonister resulterer i god fremspiring (Knudsen et al. 1997; Jensen et al. 1996; Jensen et al. 2004). Men det er også almindelig kendt at spiringen af lavvitalt frø er særlig følsom for underskud af ilt (Basra, 1995; ISTA, 1995). Den øgede konkurrence om ilten kan opstå på baggrund af en øget udskillelse af exudater i lavvitalt frø, der skaber øget vækst af mikroorganismer (Short & Lacy, 1976; Gorecki et al. 1985; Basra, 1995). Det er tidligere observeret at bejdsning af lavvitalt gulerodsfrø med IK726 har givet reduceret fremspiring i forhold til ubehandlet (Jensen, pers. komm.).

Forsøgene har vist at IK726 vokser under de kolde forhold under stratificeringen. Den konkurrencemæssige fordel, der kan være ved at antagonisten etableres på frøets testa - hvor roden bryder - kan bidrage dels til at nedbringe andre mikroorganismer på frøet allerede under stratificeringen og dels til at beskytte frøplanten i marken. I undersøgelsen er det demonstreret, at det er muligt at øge fremspiringen i frøbede under naturlige betingelser.

Det kan således konkluderes at

- *Pythium* spp og *Fusarium* spp. spiller en stor rolle for sygdomsudviklingen i frøbede af nordmannsgran i Fosdal planteskole
- stratificeringslængder kan have en stor betydning for den totale fremspiring
- *Clonostachys rosea* IK726 kan kolonisere frø ved de lave temperaturer under stratificeringen
- præparaterne TRI003 (*Trichoderma harzianum*), *C. rosea* IK726 og en coating af frø med ler kan fremme spiringen i *Abies nordmanniana* frøbede med mere end 100%.
- *C. rosea* IK726 har vist evne til sygdomsbekæmpelse af såvel frøbårne patogener som *Fusarium* spp og *Papulaspora immersa* som jordbærent *Pythium ultimum* var *ultimum*
- Effekten af IK726 er størst ved en tilsætning til frø ved stratificeringens begyndelse
- Der var højt plantetal, hvor fremspiringsperiode i marken var kort, enten dette skyldes brug af antagonister eller ler, der øger fremspiringshastigheden, et vitalt frøparti, og/eller gunstige fremspiringsforhold i marken.
- Anvendelse af mindre såtæthed og udlægning af sand før udsåning resulterede ikke i gavnlig effekt for fremspiring. Under den givne (ringe) tilgængelighed af vand hæmmede sandlaget spiringen i voldsom grad.

Samlet set viser forsøgene at effekten af antagonist kan variere fra år til år. De positive tendenser der ses ved antagonistbehandlinger integreret i forbehandlingen giver dog grundlag for at optimere virkningen med henblik på anvendelse i praksis på lidt længere sigt ved forskellige tiltag som oprides i perspektivafsnittet (kapitel 10)

10 Perspektivering

Anvendelse af mikrobiologisk bekæmpelse af sygdomme i forbindelse med skovfrø er et nyt og ret udforsket forskningsområde. Der findes ikke tilsvarende undersøgelser for frø af nordmannsgran, hvilket formodentlig hovedsagelig skyldes betydningen af planten på verdensplan. En anden faktor (som har betydning i forsøgstilrettelægningen) er vanskelighederne ved at opnå standardiserede frø. Set i dette lys kan resultaterne i indeværende projekt danne grundlag for et videre arbejde hen imod praktisk anvendelse. Et sådant arbejde kan såvel gå i retning af en dybere forståelse for dynamikken i bekæmpelsen (se afsnit 10.1), som i en praktisk orienteret retning, hvor flere relevante parametre inddrages i en samlet vurdering af mulighederne for at tilrettelægge optimale antagonistbehandlinger til fremme af dyrkningen af sunde nordmannsgran på en rentabel måde (se afsnit 10.2 og 10.3).

10.1 Frøets respons på antagonistbehandling

Resultaterne har vist at der er gode perspektiver med anvendelse af *Clonostachys rosea* IK726 og TRI 003 (*Trichoderma harzianum*), der også har vist effekt i andre afgrøder inficeret med lignende patogener. Antallet af testorganismer var få (fire) men til gengæld blev resultaterne for de to ovenstående antagonister validerede i mange forsøg. Det er interessant at *Abies*-spermosferen i lighed med forholdene for flere andre frøtyper kan være substrat for antagonisters kolonisering. Det er generelt ikke velundersøgt hvilke exudat-molekyler der udskilles gennem imbibering og spiring, men der forekommer store forskelle i exudaters sammensætning imellem forskellige frøtyper (Nelson 2004). Betydningen af økologien af det mikrobielle samfund der findes på frøene i forhold til bekæmpelse er heller ikke undersøgt men påpeges bl.a. i Nelsons review (2004) at repræsentere "the greatest need of research". I indeværende undersøgelser blev der i undersøgelserne fokuseret på patogene svampe og derfor anvendt overfladesterilisering. Fra undersøgelser på agern er det vist, at den mikrobielle sammensætning her er særdeles divers (Knudsen et al. 2004). Frøenes modtagelighed overfor sygdomsangreb er oftest beskrevet som størst indenfor en meget kort periode af fremspiringen på 12-24 timer, dette gælder særligt for *Pythium ultimum* (Osburn & Schroth 1988; 1989). For at optimere en behandlingsstrategi vil det være interessant at få fastslået, hvordan interaktionen mellem naturligt forekommende og introducerede mikroorganismer på frø foregår, hvorledes beskyttelsen sker og hvilke exudatmolekyler der udskilles – og hvornår - hos *Abies nordmanniana*. I denne sammenhæng kunne det også være relevant at undersøge om nogle af de naturligt forekommende mikroorganismer, der f.eks. opformeres i stratificeringen kan virke spiringsfremmende.

10.2 IPM strategi

I forsøgene er der arbejdet med i alt fire frøpartier. I partierne er der demonstreret pludseligt fald i vitalitet, forskelle i spireevne og forekomst af forskellige sygdomsniveauer. Derimod er det ikke undersøgt om frøenes afstamning influerer på modtagelighed mod sygdom. Sammenlignende

undersøgelser i smitteforsøg med mange partier kunne her være nyttige. Der er gode perspektiver i at anvende en IPM strategi med fokus på optimal frøkvalitet (inklusive frøteknologier som stratificering og kvalitetssortering), anvendelse af antagonistiske svampe og optimale dyrkningsbetingelser. Herunder vil det være interessant at få belyst, hvilken rolle dyrkningen af forkulturer kan spille i en sådan integreret strategi. Der blev i et andet, netop afsluttet pesticidforskningsprojekt (Larsen et al., 2004) konkluderet at en forkultur med korsblomstrede afgrøder i visse tilfælde kan virke biosanerende. Samtidig blev det vist at en dampbehandling hæmmede den generelle svampebiomasse (Larsen et al., 2004). Ved anvendelse af dampbehandlinger er det oplagt, at der er perspektiver i at kombinere denne med anvendelse af nytteorganismer, herunder hurtigt voksende saprofytiske antagonister som *Trichoderma* eller *Clonostachys*, der kan etablere sig i det skabte biologiske vacuum (James, 1987; Bihan et al 1997) og hindre efterfølgende invasion af patogener. Et andet område, der i indeværende forsøg ikke blev afdækket til bunds, er muligheden for at optimere jordens tekstur, da denne oplagt har betydning for såvel fremspiring som udvikling af sygdomme. Sådanne optimeringer vil dog være lettere at omsætte i praksis i containerkulturer (se nedenfor).

10.3 Behandling med antagonister i andre dyrkningsystemer

I de indeværende undersøgelser er der udelukkende fokuseret på den del af skovplanteskoledriften, der knytter sig til barrods produktion af frøplanter på bede. En anden del der har fået stigende interesse er produktion af frøplanter i containere og den udgør i flere lande, f.eks. Sverige (Nyström et al, 2001) allerede størstedelen af produktionen. Her er det et stort ønske fra erhvervet at man kan opnå en sikker spiring ved udsåning af ét frø per plug (pote). For *Abies nordmanniana* er dette mål ikke muligt at opfylde i øjeblikket. Undersøgelser har vist at skønt de jordbårne patogener her udgås, kan den frøbårne smitte til gengæld give anledning til større grad af sygdom (Sutherland, 1991). Gennem de indeværende undersøgelser er det åbenbart, at der er behov for en videreudvikling af kvalitetsstyringen af frøpartierne gennem optimeringer af forholdene - fra plukning af kogler til sortering m.v. og frem til udsåning af frøene. Herunder er der behov for yderligere teknologiudvikling på flere niveauer, hvor en optimering af tilsætning af antagonistiske mikroorganismer kan være et vigtigt bidrag til sikring af spiringen. Inden for potteplante sektoren er det en anvendt strategi at tilsætte antagonistiske præparater til pottemulden ved omplantning. Tilsætning af nyttesvampe til pottejord eller plantehullet i bedet, eller dypning af småplanterne er også inden for skovbruget, teknologier, der kunne være teknisk mulige, hvis der er behov for det. Det vil derfor være gode perspektiver i at videreudvikle formuleringsstrategier af de virksomme antagonistiske svampe primært i forhold til anvendelse sammen med stratificeringen og evt. i forhold til tilsætning til rødder eller jord.

11 Litteratur

Ahamad, J.S. & Baker, R. 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77: 182-189.

Basra, A.S., 1995. Seed Quality. Basic mechanisms and Agricultural Implications The Haworth Press, NY. 389 pp

Bihan, B. Le, Soulas, M.L., Camporota, P. Salerno, M.I & Perrin, R. 1997. Evaluation of soil solar heating for control of damping-off fungi in two forest nurseries in France. *Biol. Fertil. Soils* 25: 189-195

Capieau, K, Stenlid, J & Stenström, E. 2004. Potential for biological control of *Botrytis cinerea* in *Pinus sylvestris* seedlings. *Scand. J. For. Res.* 19: 312-319.

Collett, D. 1991, *Modelling Binary Data*. Chapman & Hall, London

Cram, M.M. 2003. Damping –off. *Tree Planters' Notes* 50, 9-13.

Dick, M.W. 1990. *Keys to Pythium*. Publ. Dick, Reading. 64pp.

Ferdinansen, C & Jørgensen, C.A. 1938-39. *Skovtræernes sygdomme*, Gyldendal.

Gorecki RJ, Harman GE, Mattrick LR 1985. The volatile exudates from germinating pea seeds of different viability and vigour. *Can J. Bot.* 63: 1035-39

Green, H. & Jensen, D. F. 2000: Disease progression and biocontrol of *Pythium ultimum* var. *ultimum*. The use of a rhizobox system to study the spread by active mycelial growth. *Phytopathology* 90: 1049-1055.

Gillmann, D. 2001. Seedling root and crown rots of woody plants. http://www.umassgreeninfo.org/fact_sheets/diseases/seedling_rot.htm

Harman G.E. 1996. *Trichoderma* for biocontrol of plant pathogens: From basic research to commercialized products. www.nysaes.cornell.edu/nt/bcconf/talks/Harman.html

Harper, SHT & Lynch; JM 1979 Effects of *Azotobacter chroococcum* on barley seed germination and seedling development. *Journal of General Microbiology* 112: 45-51

Hoefnagels, M.H. & Linderman, R.G. 1999. Biological suppression of seedborne *Fusarium* spp. during cold stratification of Douglas Fir seeds. *Plant Disease* 83: 845-852

Holliday, P. 1989. *A dictionary of plant pathology* Cambridge University Press, Cambridge. 369 pp

ISTA, 1987. Working Sheet no. 63, Ista Handbook of Seed Health Testing, Zurich, Switzerland.

ISTA, 1995 Understanding Seed Vigour. Zurich, Switzerland

ISTA 1996. International Rules for Seed Testing, 1996. Seed Sci. Technol. 24 Supplement.

James, R.L. 1989. Effects of fumigation on soil pathogens and beneficial microorganisms. In: Proceedings of the intermountain forest nursery association USDA, Bismark (ed. Landis T.D) pp 29-34

Jensen, B., Knudsen, I.M.B., Jensen, D.F. & Hockenhull, J. 1996. Application of antagonistic microorganisms to seeds to control fungal plant pathogens. Combined Proceedings International Plant Propagators' Society 46: 256-262.

Jensen, B., Knudsen, I.M.B, Jensen, D.F. 2000b. Biological seed treatment of cereals with fresh and long-term stored formulations of *Clonostachys rosea*: Biocontrol efficacy against *Fusarium culmorum*. Eur. J. Plant Pathology 106: 233-242.

Jensen, B., Knudsen I.M.B. & Jensen, D.F. 2002. Survival of *Clonostachys rosea* on stored barley seeds and their biocontrol efficacy against seed-borne *Bipolaris sorokiniana*. Biocontrol Science and Technology 12: 427-441.

Jensen, B., Knudsen, I.M.B, Madsen, M & Jensen, D.F. 2004. Biopriming of infected carrot seed with an antagonist selected for control of seedborne *Alternaria* spp. Phytopathology 94: 551-560.

Jensen, L. E., Lübeck, M., Lübeck, P., Nybroe, O & Knudsen, I.M.B. 2000a. Overlevelse i miljøet. Miljøforskning 43: 13-16.

Jensen, M. 1997. Moisture content controls the effectiveness of dormancy breakage in *Abies nordmanniana* (Steven) Spach seeds. In: Basics and Applied Aspects of Seed Biology (Eds. Ellis, R.H., Black, M., Murdoch, A.J & Hong, T.D.) pp 181-190.

Johansen, A, Knudsen, I.M.B. Binnerup, S.J. Winding, A., Johansen, J.E., Jensen, L.E., Andersen, K.S., Svenning, M.M. & Bonde, T.A. 2005 (in press) A greenhouse study of non target effects of the microbial control agents *Pseudomonas fluorescens* DR54 and *Clonostachys rosea* IK726 in field soil grown with barley followed by sugar beets. Soil Biol. Biochem.

Knudsen, I.M.B. 2000. Biologisk bekæmpelse af rodfiltsvamp i kartoffel er en realistisk mulighed. Kartoffelproduktion 26: 20-21.

Knudsen, I.M.B., Hockenhull, J. & Jensen, D.F. 1995. Biocontrol of seedling diseases of barley and wheat caused by *Fusarium culmorum* and *Bipolaris sorokiniana*: effects of selected fungal antagonists on growth and yield components. Plant Pathology 44: 467-477.

Knudsen, I.M.B., Jensen, B., Jensen, D. Funck & Hockenhull, J. 1996. Colonization of *Gliocladium roseum* on barley roots from sand and field soil. In: "Monitoring antagonistic fungi deliberately released into the environment". (D.

Funck Jensen, H-B. Jansson & A. Tronsmo eds.). Kluwer Academic Publishers. 33-37.

Knudsen, I.M.B., Hockenhull, J, Jensen, D.F., Gerhardson, B., Hökeberg, M., Tahvonen, R., Teperi, E., Sundheim, L & Henriksen, B. 1997. Selection of biological control agents for controlling soil and seed-borne diseases in the field. A mini-review. Eur. J. Plant Pathol. 103: 775-784.

Knudsen, I.M.B., Thomsen, K.A., Jensen, B. & Poulsen K.M. 2004. Effects of hot water treatment, biocontrol agents, disinfectants and a fungicide on storability and control of the pathogen *Ciboria batschiana* on English oak acorns. For. Path. 33: 47-64.

Kozłowski, G. & Métraux, J.-P. 1998. Infection of Norway spruce (*Picea abies* (L.)Karst.) seedlings with *Pythium irregulare* Buism. and *Pythium ultimum* Trow.: histological and biochemical responses. Eur. J.Plant Pathol. 104: 225-234.

Larsen J. Ravnskov S. Møller, K. & Bødker, L.2004 Bæredygtig produktion af småplanter i forstplanteskoler. Miljøstyrelsen. 63pp

Lübeck, M., Knudsen, I.M.B., Jensen, B., Thrane, U. & Jensen, D.F. 2002 GUS and GFP transformation of biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726 and the potential for using these marker genes in ecological studies. Mycol. Res. 106: 815-826.

Motta, E., Annesi, T. & Balmas, V. 1996. Seedborne fungi in Norway spruce: testing methods and pathogen control by seed dressing. Eur. J. For. Path. 26: 307-314.

Møller, K., Jensen, B., Andersen, P.A, Stryhn, H & Hockenhull J. 2003. Biocontrol of *Pythium tracheiphilum* in Chinese cabbage by *Clonostachys rosea* under field conditions. Biocontrol Science and Technology 13: 171-182.

Møller, Kaare (pers. information) Danmarks Jordbrugsforskning, Flakkebjerg, Forsøgsvej 1, 4200 Slagelse

Neergaard, P. 1979. Seed Pathology The Macmillan Press Ltd, London 839 pp.

Nelson, E.B. 2004 Microbial dynamics and interactions in the spermosphere Ann. Rev. Phytopatology 42: 271-309

Nyström, C. Hannerz, M., Stenström, E. & Lindelöw, Å. 2001. Enkätundersökning om skogplantkolornas miljöpåverkan. SkogForsk, Uppsala. Arbetsrapport 484, 13pp

Osburn HJ, Schroth MN 1988. Effect of osmopriming sugar beet seed on exudation and subsequent damping off caused by *Pythium ultimum*. Phytopathology 78: 1246-50

Osburn RM, Schroth MN, Hancock JG & Hendson M, 1989 Dynamics of sugar beet seed colonization by *Pythium ultimum* and *Pseudomonas* species:effects on seed rot and damping-off. Phytopathology 79: 709-16

Procházková, Z 1991. The occurrence of seed-borne fungi on forest tree seeds in the years 1986-1991. Communicationes Instituti Forestalis, Cechoslovaca 17: 107-123.

- Ruegger, A, Winzeler H & Wosberger, J 1990 Studies of the germination behaviour of spelt (*Triticum spelta* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) under stress conditions. Seed Science and Technology 18: 311-320.
- Short GE, Lacy ML 1976 Carbohydrate exudation from pea seeds : Effect of cultivar, seed age, seed color and temperature. Phytopathology 66:182-87
- Stenström, E., Capieau, K. & Ihrmark, K. 2000. Specific detection methods and control of pathogens of conifer seedlings in Swedish forest nurseries
Abstract: International Conference on Microbial Antagonism against Fungi. Swedish University, Uppsala, Sweden 13-15 June.
- Sutherland, J.R. 1991. Management of pathogens in seed orchards and nurseries. For. Chron. 67: 481-485
- Sutton, J.C 2000. Biological control of *Botrytis cinerea* in conifer tree seedlings.
Abstract: International Conference on Microbial Antagonism against Fungi. Swedish University, Uppsala, Sweden 13-15 June.
- Wicks, T.J. Morgan, B. & Hall, B. 1995. Chemical and biological control of *Rhizoctonia solani* on potato seed tubers. Australian Journal of Experimental Agriculture 35: 661-664.
- Wulff, E.G., Mguni, C.M., Mortensen, C.N., Keswani, C.L. & Hockenhull, J., 2002. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with the antagonistic strain *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. Eur. J. Plant Pathol. 108: 317-325.
- Yakimenko E.E. & Grodnitskaya, I.D., 2000. Effect of *Trichoderma* fungi on soil Micromycetes that cause infectious conifer seedling lodging in Siberian tree nurseries. Microbiology 69: 726-729.
- Ærø Hansen, V. 1997. Biologisk frøbejdsning med *Gliocladium roseum*. Bachelor opgave, Institut for Plantebiologi, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole. 41pp.