

Biologisk kontrol: Coating af frø med gram-negative bakterier

www.maribo.com

Hans Chr. Pedersen

DanSeed Symposium,
26-27 februar 2008



→ Mikroorganismer er naturligt forekommende i de miljøer, hvor frø udsås

Der er normalt op til 10^8 (100.000.000) mikroorganismer/gram muldjord

→ I relation til frøspiring og plantevækst er mikroorganismer

- Positive (Vækststimulerende; Beskyttende)
- Negative (Væksthæmmende; Patogene)
- Neutrale (- Eller næsten neutrale; Langt de fleste arter)

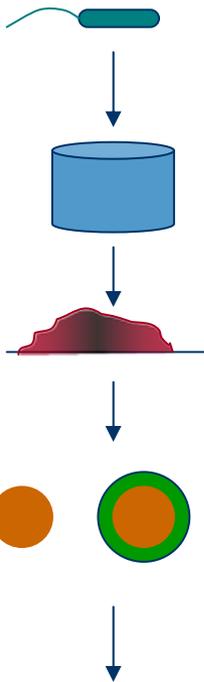
→ Anvende positive mikroorganismer til

- **Biologisk kontrol (BCA's)**
- **Vækststimulering (PGSA's)**

...ved tilførsel til vækstmediet eller direkte på frø inden udsåning

→ Frøteknologiske muligheder (Specielt sukkerroefrø)

SCREENING OG SELEKTION



Gram-negative bakterier

Multiplikation

Stabilisering

Bærestof (Carrier)

Application på frø

Stabilitet i carrier

Stabilitet på seed

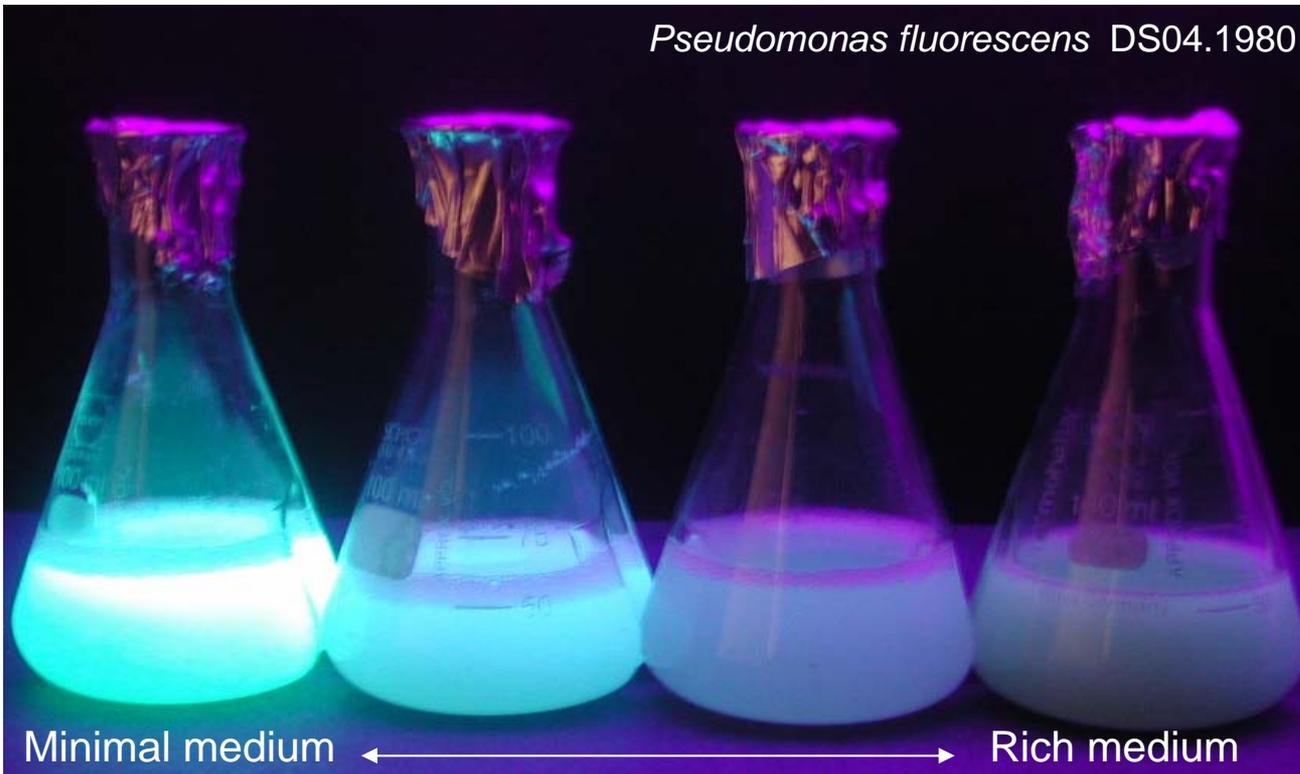
Produkt funktionalitet

Lagring

→ Gram-negative bakterier...

- Har i forsøg vist stort potentiale både som BCA's og som PGSA's
- Desværre ikke videre udtørringstolerante ($A_w > 0,95$)

Pseudomonas fluorescens DS04.1980



Vigtige slægter som *Pseudomonas* og *Rhizobium* er Gram-negative bakterier.

P. Fluorescens DS 04.1980 er en siderophore-producerende stamme. (Siderophorer er metalbindende molekyler).

Nogle siderophorer er kendt for at kunne inducere resistens i planter.

Biocontrol agents (**BCAs**)
mod rodbrand sygdomme i
sukkerroer

Plant growth stimulating
agents (**PGSAs**)



Rhizoctonia solani



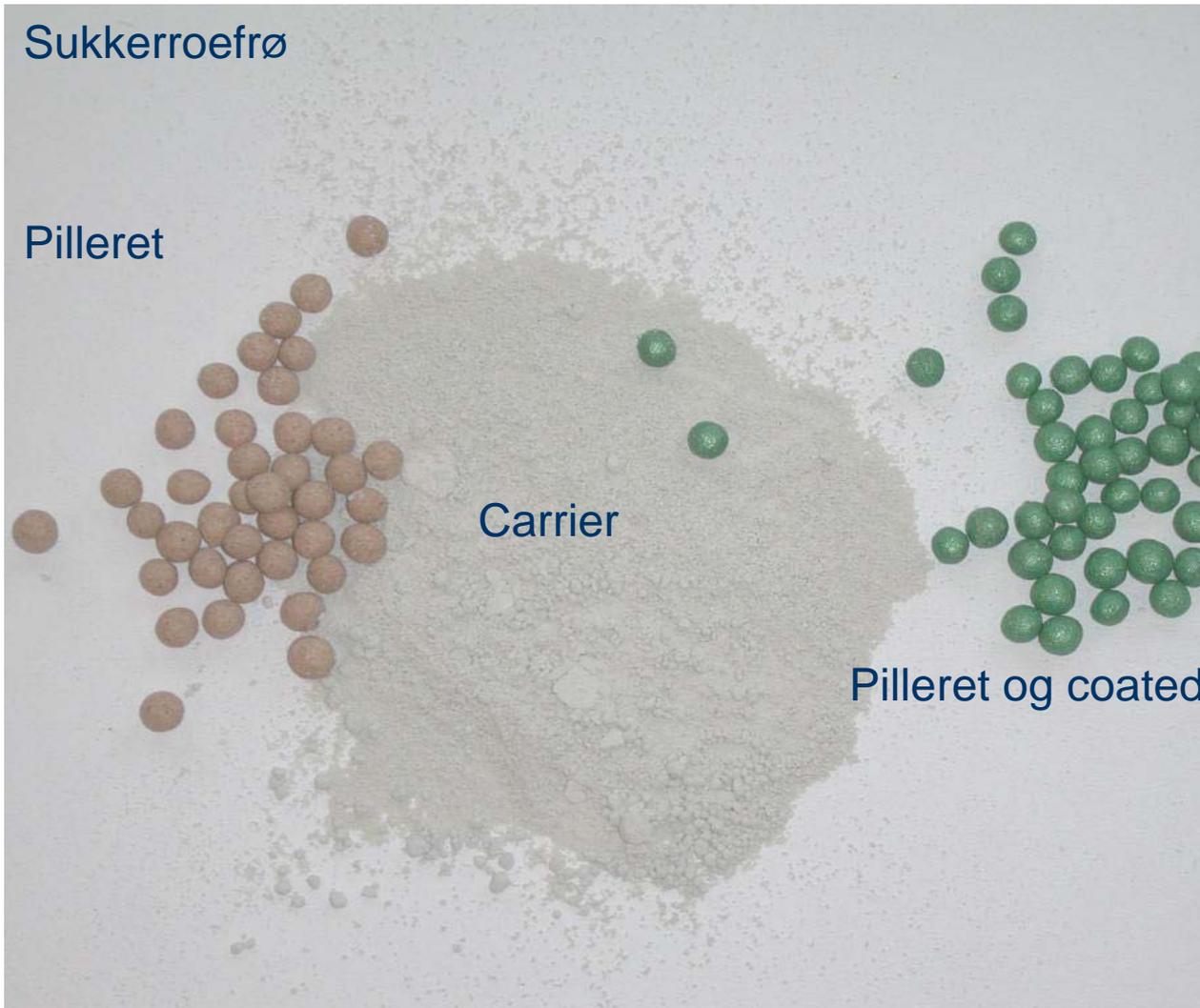
DS00.0103

→ Biologiske kriterier for mikro-organismen

- **Væksten skal begynde straks efter såning**
- **Hurtig vækst på og langs plantens rødder**
- **Vækst og aktivitet ved tilstedeværelse af insekticider og evt. fungicider.**
- **Ingen konkurrence med frøet/småplanten om næringsstoffer og ilt m.v.**
- **I tilstedeværelsen af naturligt forekommende mikroorganismer skal den være den dominerende kolonisator på det spirende frø og i rhizosphæren.**
- **Ingen fytotoksisk effekt**
- **Stabil under varierende mark- og vækstbetingelser**

→ Produkt- og produktions kriterier

- **Lang holdbarhed (Shelf-life) på frøet (> 6 måneder)**
- **Ingen negativ effekt på pille (Såbarhed)**
- **Ingen negativ effekt på pille-komponenter**
- **Ingen negativ effekt (f.eks. nedbrydning) på tilsatte insekticider og fungicider**
- **Lønsom produktion**
- **Let at håndtere**
- **Opfylde sikkerhedsforskrifter / Miljøvenlig.**



Bakterierne lægges i et bærerstof – en carrier – der er egnet til coating af frø.

Vandaktiviteten (A_w) i denne carrier er meget lav.

FE 2005

Bakterie	Carrier	Seed
00.0103	9,95E+08	7,50E+04
01.0155	4,95E+08	5,90E+04
04.1014	1,37E+08	4,37E+04
04.1026	1,34E+08	5,25E+04
04.1101	6,10E+08	4,20E+03
04.1128	2,15E+08	3,98E+03
04.1246	7,25E+08	5,03E+04
04.1278	4,50E+08	2,13E+03
04.1406	9,05E+08	8,58E+04
04.1411	4,60E+08	4,58E+04
04.1486	4,80E+08	5,34E+04
04.1513	4,45E+08	4,10E+04
04.1691	7,55E+08	2,13E+03
04.1720	1,41E+09	8,68E+04
04.1754	4,20E+08	2,84E+04
04.1772	8,35E+08	9,98E+03
04.1873	9,80E+08	7,10E+04
04.1874	7,50E+08	7,74E+04
04.1942	1,33E+09	1,83E+03
04.1980	7,65E+07	4,04E+04
04.1981	6,25E+08	7,18E+03
04.2113	7,75E+07	1,77E+04
04.2157	1,40E+08	3,44E+04
04.2171	6,85E+08	6,13E+04
04.2179	4,10E+08	2,90E+04
04.5019	1,13E+09	1,20E+04
04.5021	1,45E+09	9,80E+04
04.5022	1,15E+09	1,25E+05
04.5023	1,05E+09	1,10E+05
04.5030	4,45E+08	3,40E+04

Carrier 10^8 - 10^9 CFU/gram

Frø $\sim 5 \cdot 10^4$ CFU/frø

Shelf-life > 1 år

Ingen negative indvirkninger på...

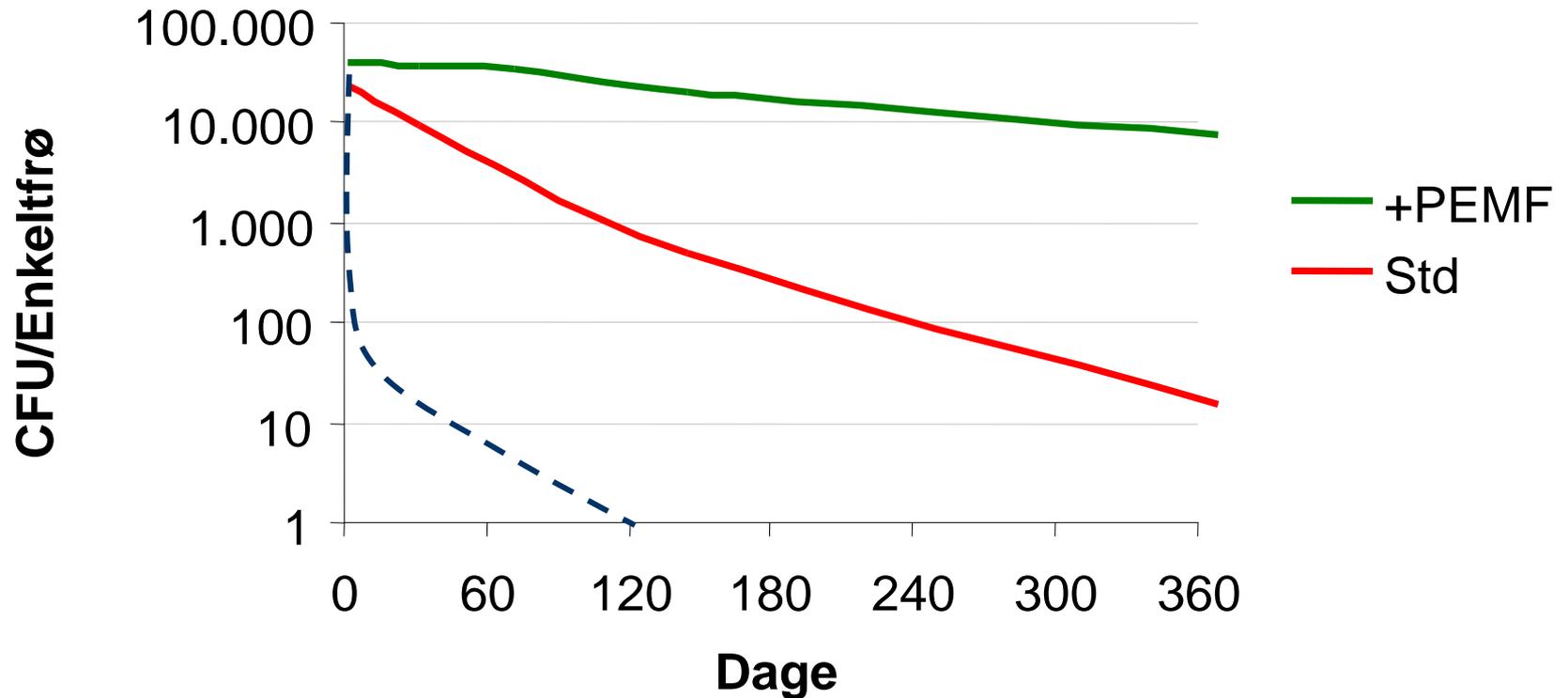
Pellet komponenter (fungicider + insecticider)

Lagringsevne

Såbarhed

Spiring og etablering

Sikkerhed



PEMF-behandling af bakteriekulturen resulterer i overlevelse på frø i...

- tilstrækkeligt lang tid
- tilstrækkeligt højt antal

} ...til praktisk anvendelse

Ps. Fluorescens DS96.578

Effect on survival on seeds:
Exposure of cells to PEMF
before coating onto seeds.

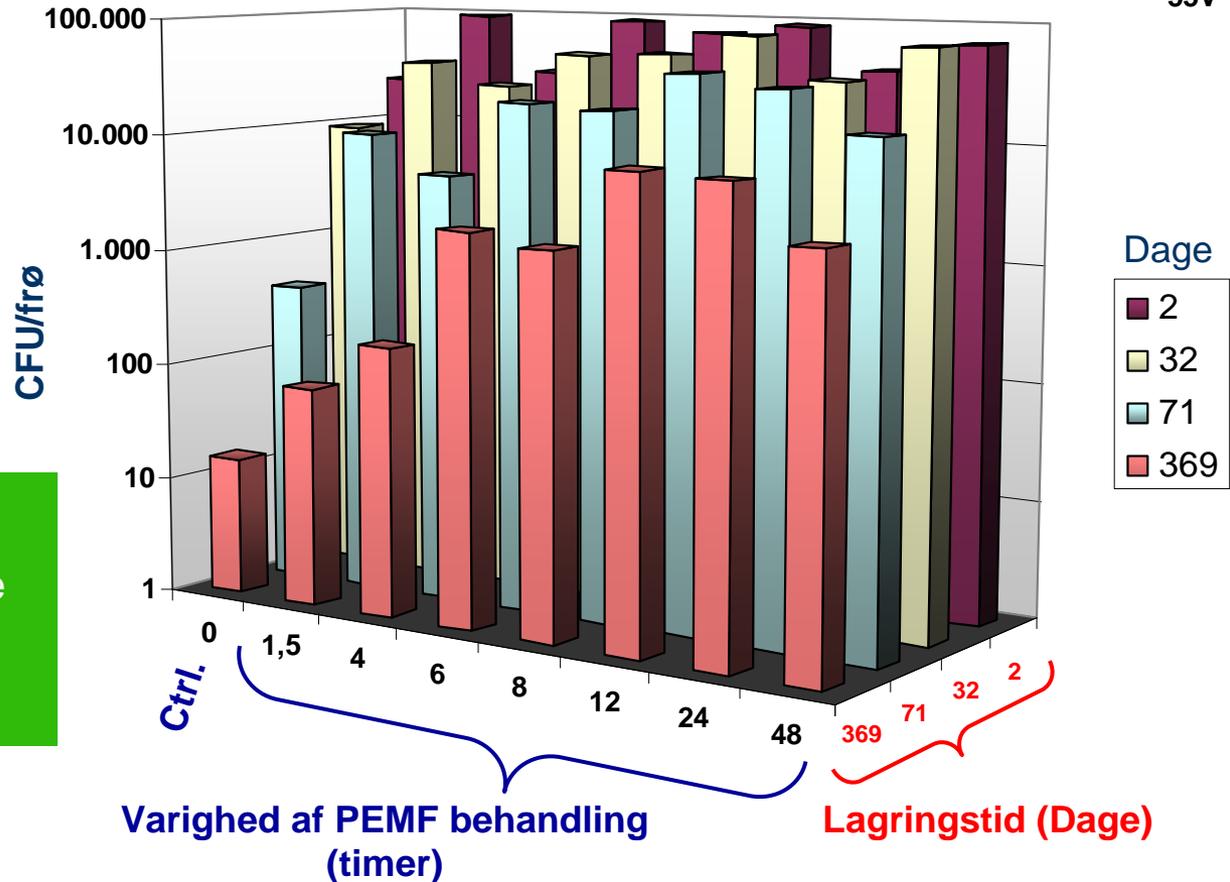
Suboptimal carrier.

Seeds stored at 10°C.

PEMF =

Pulserende Elektro-Magnetiske
Felter

ved ekstremt lav frekvens

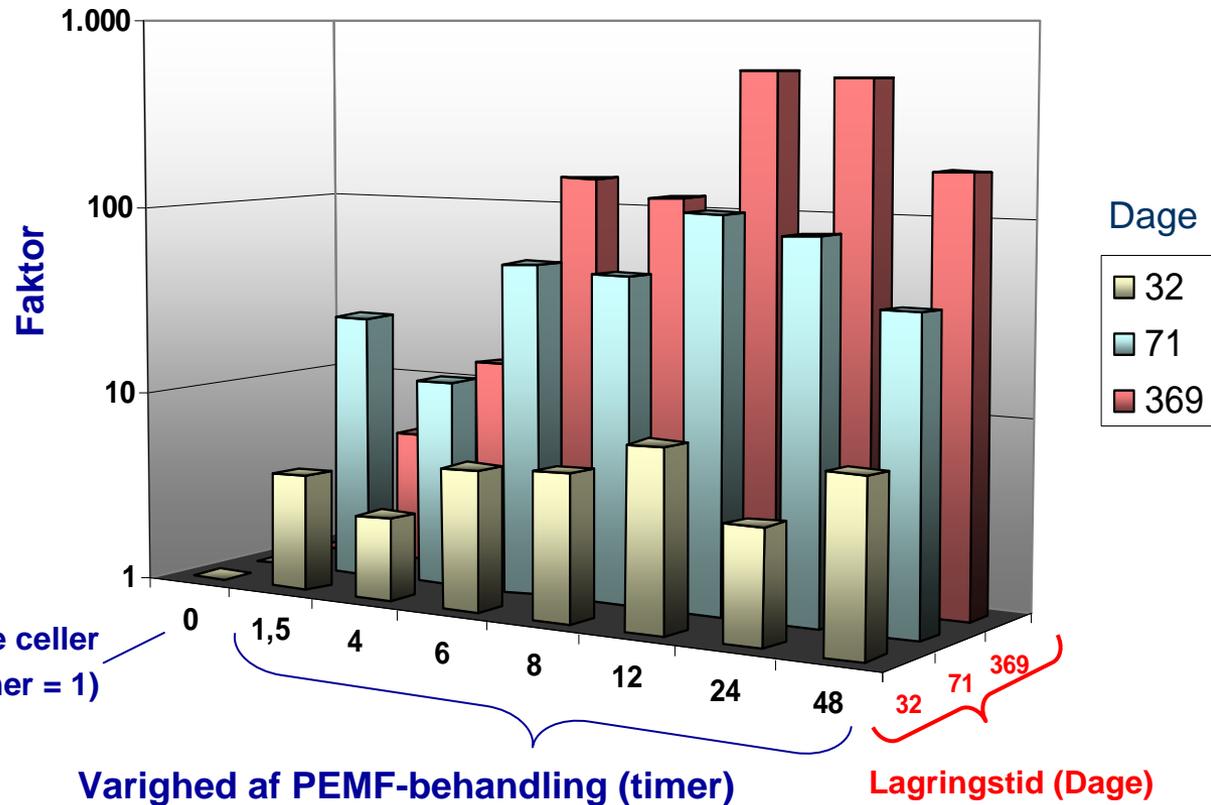


Ps. Fluorescens DS96.578

Effect on survival on seeds:
Exposure of cells to PEMF
before coating onto seeds.

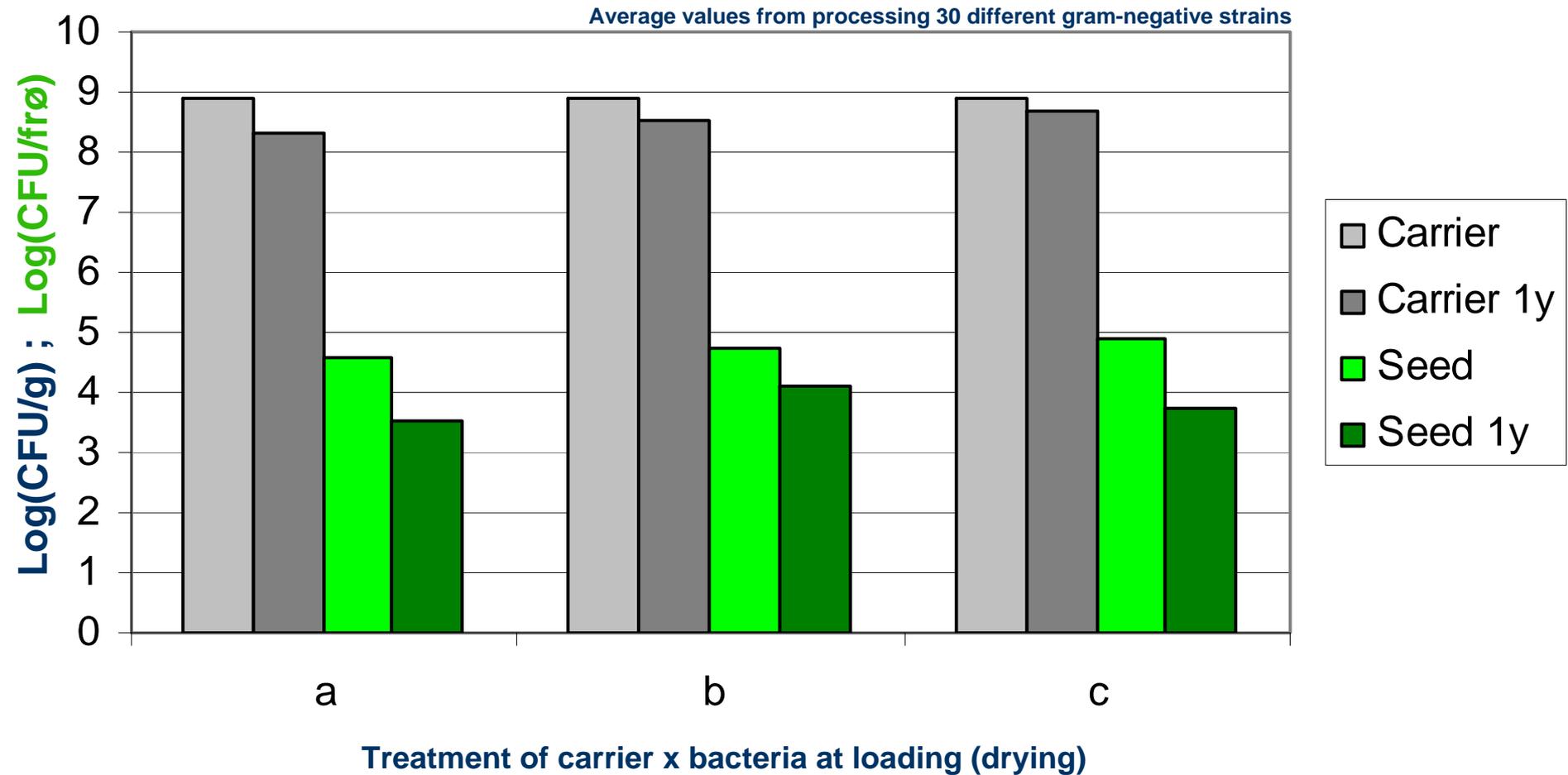
Suboptimal carrier.

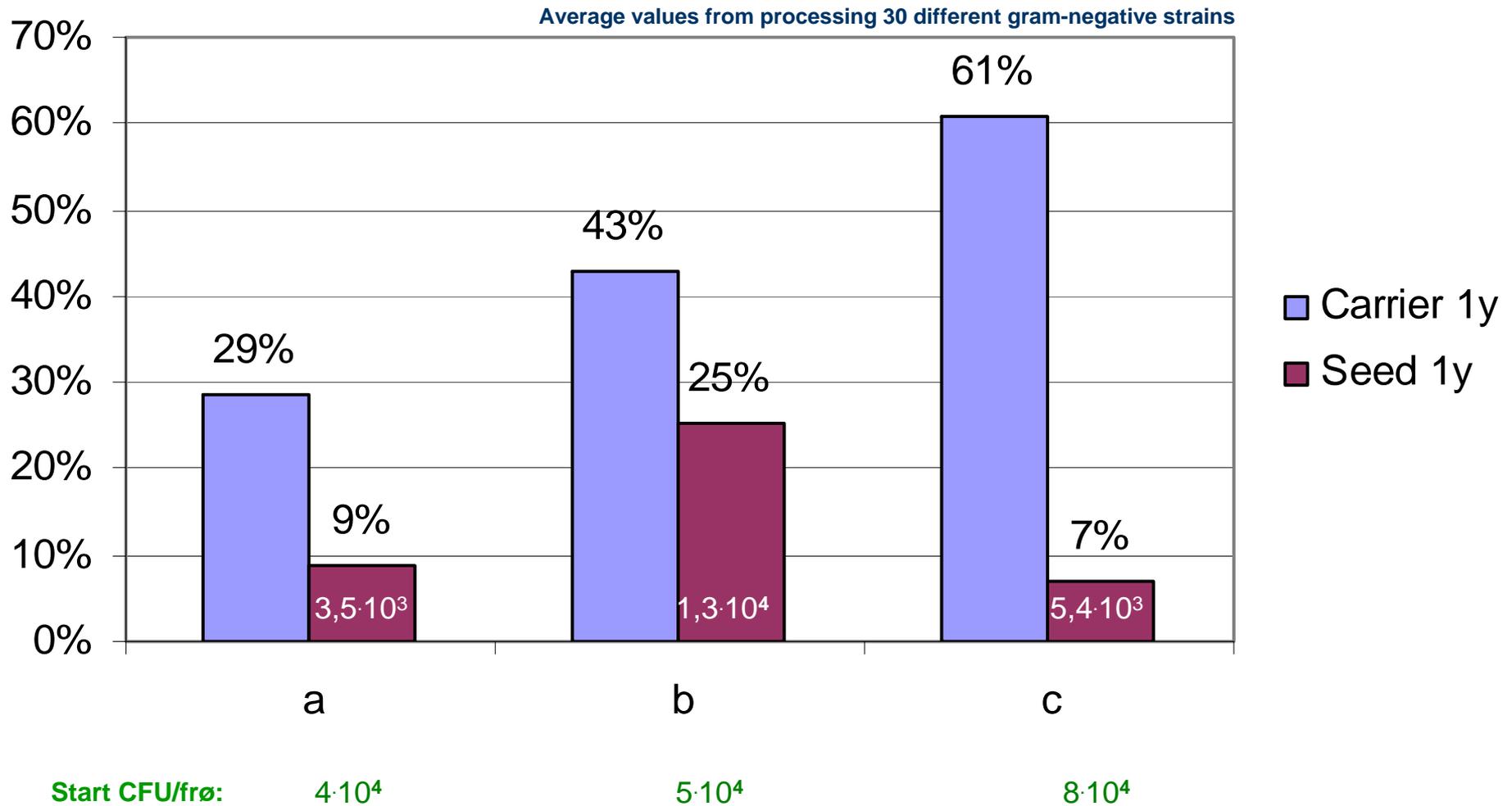
Seeds stored at 10°C.



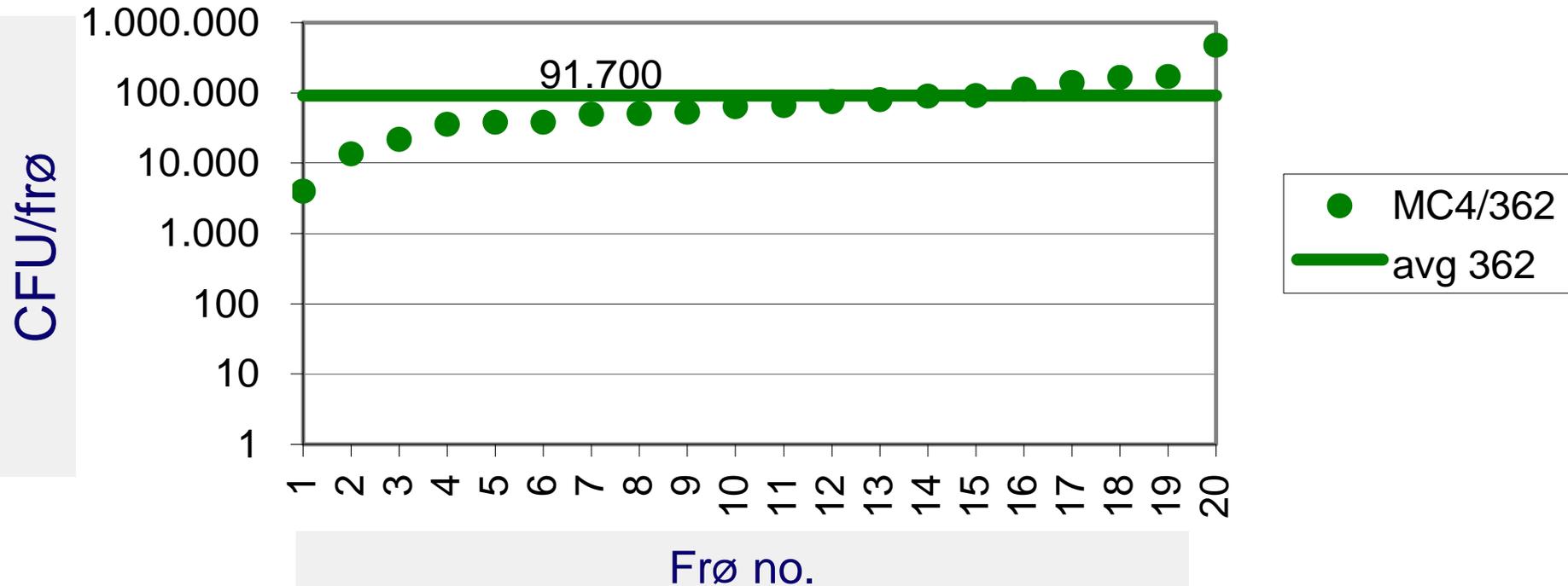
Relativt til overlevelse af ikke-PEMF'ede celler
(0 timer = 1)

Overlevelse i carrier og efter coating på frø

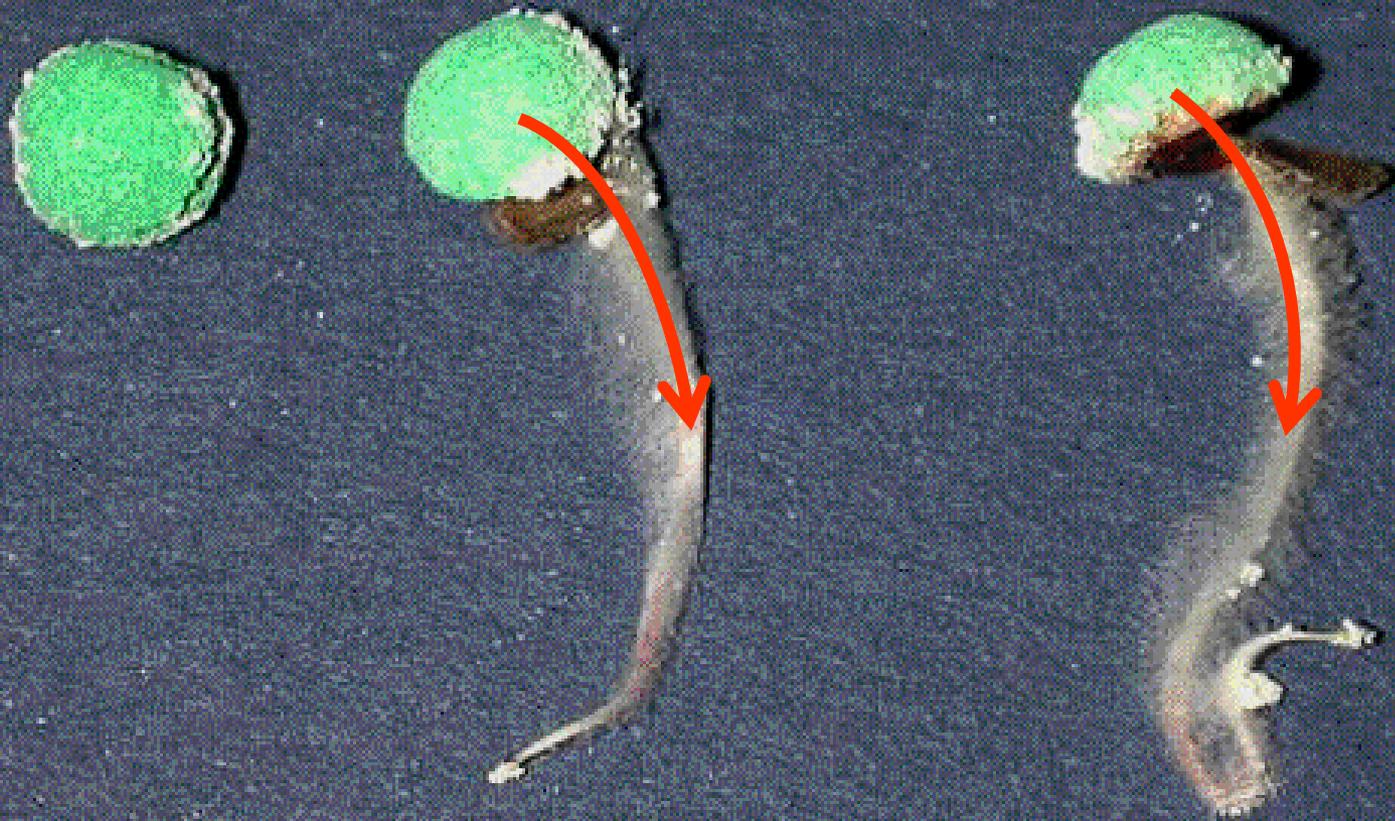


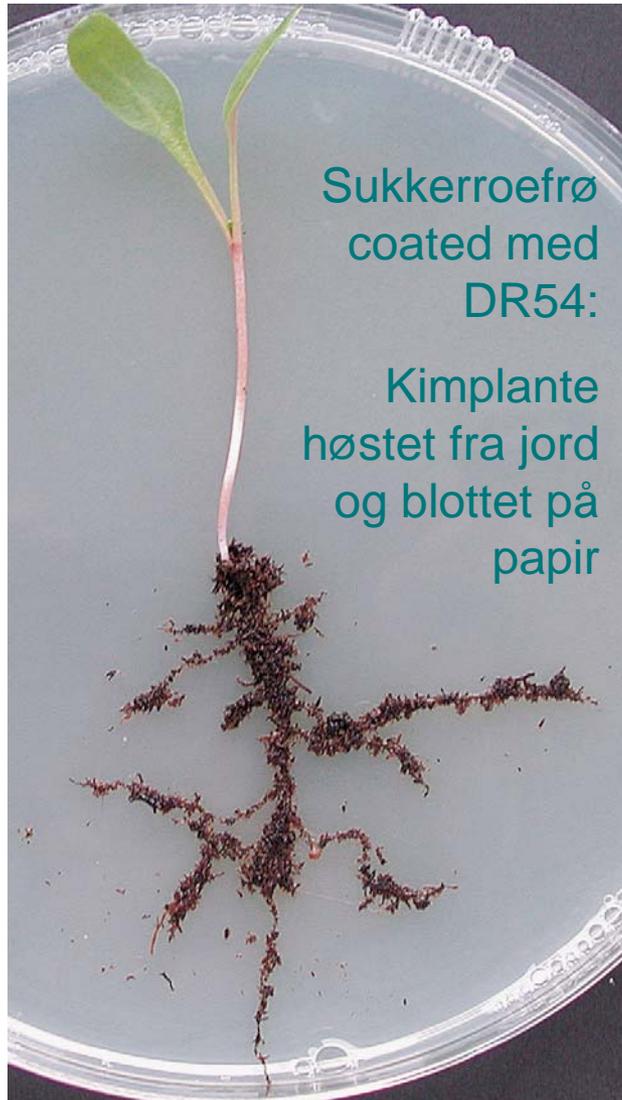


Enkelt-frø analyse



Migrerer de rodkoloniserende mikroorganismer fra coatingslaget på pillen ned til kimplantens rødder?





Sukkerroefrø
coated med
DR54:
Kimplante
høstet fra jord
og blottet på
papir

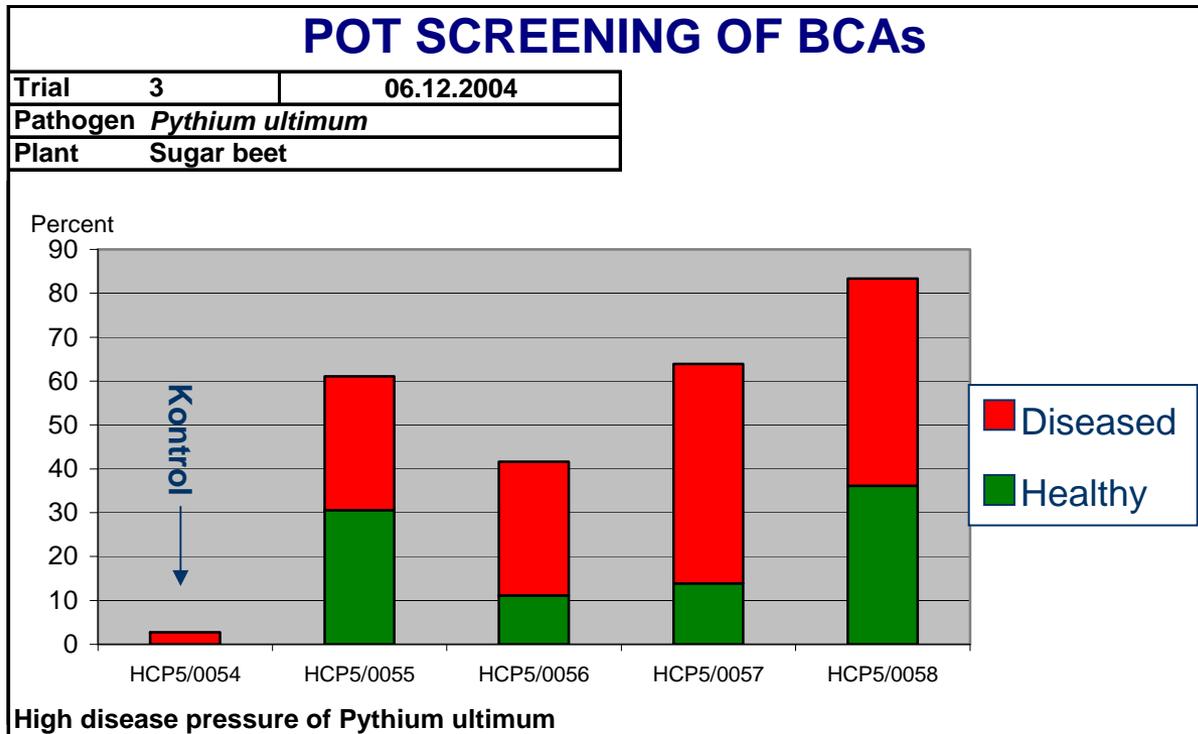
Immunoblotting



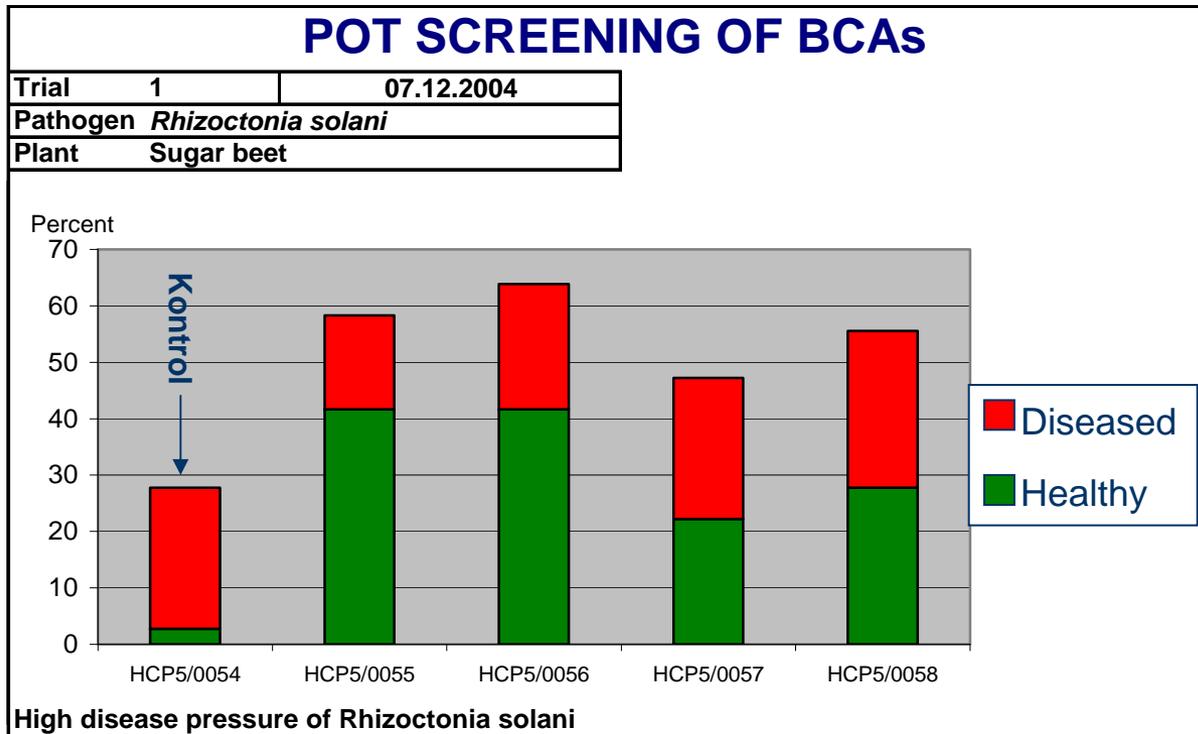
Genkendelse med antistoffer
mod *Pseudomonas
fluorescens* stamme DR54

Konklusion:
Mikroorganismene
migrerer fra frø til rod



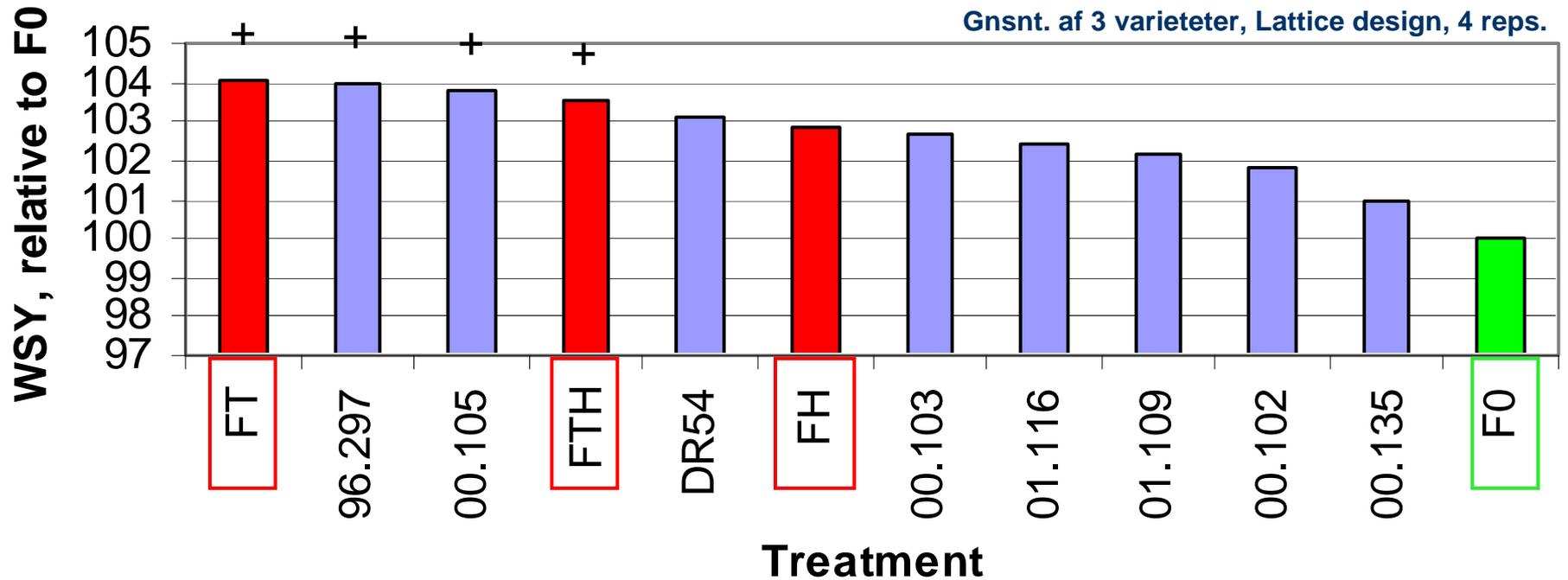


Pillerede/coatede sukkerroefrø



Pillerede/coatede sukkerroefrø

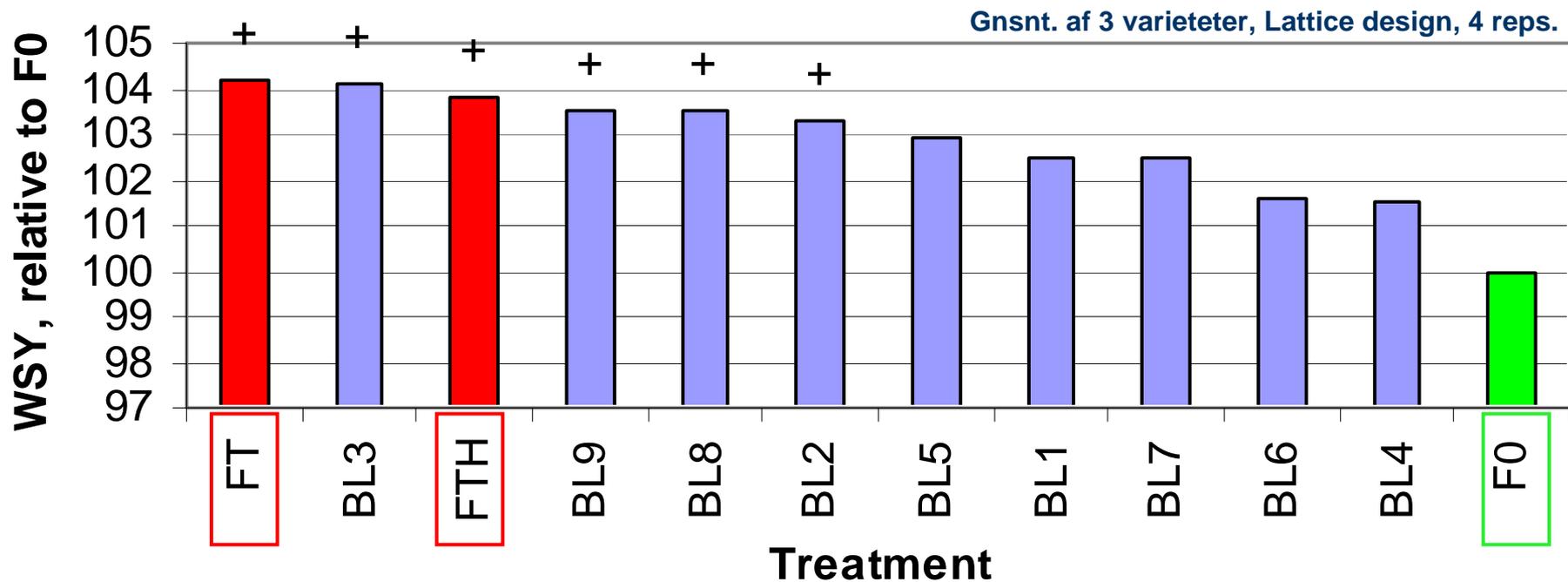
HCPYT025 2003 Vilhelmsdal, Falster DK



FXX: **T** = Thiram 6gai/U, **H** = Hymexazol 14,7gai/U, **O** = Uden fungicider.

Alle coated med Imidacloprid 60gai/U.

HCPYT023 2003 Vilhelmsdal, Falster DK



FXX: **T** = Thiram 6gai/U, **H** = Hymexazol 14,7gai/U, **O** = Uden fungicider.

Alle coated med Imidacloprid 60gai/U.

White sugar yield (WSY)

			ES (3)	DE(5)	DK(4)	All(12)
1.	Standard	(P0; P3)	100,0	100,0	100,0	100,0
2.	04.5019	(P0; P3)	100,4	100,3	101,1	100,6
3.	04.5030	(P0; P3)	104,2⁺⁺	101,1	101,2	101,9⁺⁺

Andre applikationer - Gulerod



Carrot - PMI trial 2003



Alfalfa

Piller med *Rhizobium* carrier

Piller med 0-carrier

Selektion

- Microorganismer der kontrollerer rodråd i sukkerroer er selekteret

Teknik

- System til applikation af mikroorganismer på frø
- PEMF-behandlede mikroorganismer kan lagres i lang tid på frø

Efter såning

- Mikroorganismer kan migrere fra frø-coatingen og kolonisere rødderne
- Mikroorganismene kan kontrollere angreb af rodråd i sukkerroe-marker
- Mikroorganismene er virksomme sammen med fungicider på frøet

