



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **302955**

(13) B1

(51) Int Cl⁶ C 12 Q 1/18

Patentstyret

(21) Søknadsnr	921519	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	16.10.90, PCT/GB90/01598
(22) Inng. dag	15.04.92	(85) Videreføringsdag	15.04.92
(24) Løpedag	16.10.90	(30) Prioritet	17.10.89, GB, 8923407
(41) Alm. tilgj.	12.06.92		
(45) Meddelt dato	11.05.98		
(83) Mikroorganisme deponert:	NCIMB nr. 40186, 40187, 40188, 40190		

(73) Patenthaver	Zeneca Ltd, Imperial Chemical House, Millbank, London SW1P 3JF, England, GB
(72) Oppfinner	Maria Fattori, Valdarno, IT Stefaan Renaat Maria Horemans, Korbeek Dyle, BE Marc Lefebvre, Evers, BE Keith Adrian Powell, Bracknell, Berkshire, England, GB Annabel Renwick, Bracknell, Berkshire, England, GB
(74) Fullmektig	Dag Dawes, Bryn & Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) **Benevnelse** **Antisoppmiddel, fremgangsmåte for screening av et antatt antisoppmiddel og fremgangsmåte for inhibering av soppangrep på en plante**

(56) **Anførte publikasjoner** EP 106504, US 46475233
R.M. Osburn et al, Phytopathology, vol. 79, no.6, 1989, s. 709-716
W.J. Kaiser et al, Soil Biol. Biochem. vol. 21, no 2, 1989, s. 269-273

(57) **Sammendrag**

Fremgangsmåte for screening av potensielle antisoppmidler, som omfatter undersøkelse av den inhiberende effekt av det potensielle antisoppmiddel i to undersøkelser, en første undersøkelse med hensyn til inhibering av utvikling av patogene organismer i sterilisert jord infisert med mycelium av *Pythius* spp, og en andre undersøkelse med hensyn til inhibering av sykdomsutvikling i en voksende plante av en art som er utsatt for sykdom ved rotbrann-sykdomskompleks i nærvær av dette kompleks, identifisering av midler som gir potensiell inhiberende effekt i begge undersøkelser sammenliknet med kontroll, og ytterligere undersøkelse av disse. Ved anvendelse av denne fremgangsmåte er det blitt tilveiebragt fire spesielt egnede mikroorganismer som viser antisoppaktivitet i et vidt spektrum, vist ved ytterligere undersøkelse og ved feltprøver med sykdomssopp. Fremgangsmåter for anvendelse av slike mikroorganismer og blandinger inneholdende disse er også beskrevet.

Denne oppfinnelse angår et antisoppmiddel, spesielt omfattende nye stammer av *Pseudomonas fluorescens*, og anvendelser av dette for beskyttelse av planter mot soppangrep.

Det er vanlig mikrobiologisk praksis å søke og finne mikroorganismer med interessante egenskaper ved screening av store antall, typisk mange tusen, isolater fra jord med hensyn til den aktuelle aktivitet for den påtenkte anvendelse. Én slik anvendelse er isolering av biologiske bekjempelsesmidler (BCA'er) som er aktive overfor utvalgte plantepatogener. Slike BCA'er gir alternativer eller supplementer til kjemiske midler for patogenbekjempelse.

Ved normal praksis uttas jordprøver fra feltsteder hvor den aktuelle patogene organisme viser seg å være undertrykket, siden dette kan være et tegn på at mikroorganismer i jorden i seg selv kan inhibere patogeniteten. Mikroorganismer isoleres så fra de individuelle prøver i laboratoriet ved vasking fra røtter og vekst på agar ved én eller to temperaturer som er typiske for den optimale temperatur for mikrobevekst, vanligvis fra 25 til 30°C. Isolatene blir så underkastet screening i begynnelsen mot forskjellige patogene organismer i agar i en serie petriskåler under anvendelse av dobbeltkulturmetoden. Dette representerer primær-sorteringen. Lovende isolater fra denne sortering undersøkes så nøyere i en serie sekundærsorteringer hvor det anvendes jord.

Etter vår erfaring er den tradisjonelle primærsortering hverken riktig eller tilstrekkelig selektiv for isolater som til slutt vil passere gjennom etterfølgende screening-tester og feltprøver. Den tradisjonelle primærsortering lar store antall isolater (typisk i området 20%) passere som ser lovende ut, men de fleste av disse forkastes i etterfølgende tester. Dessuten vet vi nå at primærsorteringen, i tillegg til at den lar isolater passere som deretter viser seg å mangle den egnete aktivitet, sorterer bort noen isolater som vi nå vet er meget godt egnet til å passere de etterfølgende screening-tester. Utfallet av dette er at tradisjonelle tester lar isolater passere som er dårlige, og sorterer ut isolater som er gode inhibitorer for patogenitet.

Det er et tydelig behov for en ny fremgangsmåte til screening av jordisolater for utvinning av et høyt antall potensielt gode isolater, med forkastning av så mange som mulig av materialene med dårlig aktivitet.

Ifølge den foreliggende oppfinnelse er det tilveiebragt en fremgangsmåte for screening av potensielle antisoppmidler, som omfatter at den inhiberende effekt av det potensielle antisoppmiddel undersøkes i to tester, en første test med hensyn til inhibering av utvikling av patogene organismer i sterilisert jord som inneholder mycelium av *Pythium* spp, og en andre test igjen med hensyn til inhibering av sykdomsutvikling i en voksende plante av en art som er utsatt for sykdom ved rotbrann-sykdomskompleks i nærvær av dette kompleks, idet det identifiseres midler som gir potensiell inhiberende effekt i begge tester, sammenliknet med den kontroll, og disse underkastes ytterligere undersøkelser. Fremgangsmåten for screening av antatt antisoppmiddel ifølge foreliggende oppfinnelse er karakterisert ved at den første undersøkelse omfatter preparering av et mycelium av en patogen organisme av *Pythium* spp i et lag av dyrkningsmedium, anbringelse av et lag av steril jord på dyrkningslaget, tilsetning av en porsjon av et antatt antisoppmiddel til jordlaget, inkubering av forsøksenheten og vurdering av den inhiberende effekt av antisoppmiddelet på veksten av den patogene organisme, og

den annen undersøkelse omfatter inokulering av en jordprøve med et patogent sopp-rotbrann-kompleks, såing av en plante som er utsatt for infisering med soppen, i den soppinfiserte jord, påføring av en porsjon av et antatt antisoppmiddel på jorden, idet frøet får spire og en plante får vokse fra dette, og vurdering av den inhiberende effekt av soppmiddelet på plantens helse, sammenliknet med en ikke-infisert kontroll.

Oppfinnelsen er spesielt, men ikke utelukkende, egnet for screening av mikroorganismer fra jordprøver med hensyn til potensielle BSA'er, men det er ingen umiddelbar grunn til at den samme fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen ikke skal kunne anvendes for kjemiske midler uten noen tilpasning.

Som angitt ovenfor, er den tradisjonelle måte for isolering av mikroorganismer ikke i seg selv selektiv, og den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer derfor også en for-screening-fremgangsmåte til isolering av mikroorganismer fra jordprøver, hvilken fremgangsmåte omfatter at det i en forseglbar beholder anbringes et lag av fuktig, steril sand, jordprøven anbringes under fuktige betingelser oppå dette, og i jordprøven såes et frø av en plante som er utsatt for den aktuelle sykdom, beholderen forsegles og anbringes i omgivelser som bidrar til sykdomsutvikling, idet frøet får spire og røttene får strekke seg fra jordlaget ned i sandlaget, røret skjæres på langs gjennom begge lagene, røttene uttas bare fra sandlaget og mikroorganismer isoleres fra de uttatte røtter.

Midler, kjemiske eller mikrobiologiske, som passerer de to tester foreskrevet ved denne oppfinnelse, kan så underkastes ytterligere screening med hensyn til inhibering av soppinfeksjon i én eller flere enn én ytterligere tester valgt blant:

- (a) infisering av sukkerroer med *Aphanomyces cochlioides* ved en temperatur på fra 12 til 15°C,
- (b) infisering av erter ved *Pythium ultimum* ved en temperatur på fra 12 til 15°C,
- (c) infisering av erter med *Pythium ultimum* ved en temperatur på fra 24 til 27°C,
- (d) infisering av erter med *Rhizoctonia solani* ved en temperatur på fra 24 til 27°C,
- (e) infisering av hvete med *Fusarium culmorum* ved en temperatur på fra 18 til 21°C,
- (f) infisering av soyabønner med *Phytophthora megasperma* ved en temperatur på fra 20 til 24°C,
- (g) infisering av potetskive med *Fusarium moniliforme* ved en temperatur på fra 20 til 24°C,
- (h) infisering av en potetskive med *Fusarium sambusinum* ved en temperatur på fra 20 til 24°C, og
- (i) infisering av sukkerroer med *Phoma* spp ved en temperatur på fra 15 til 19°C.

Ved at man således slår sammen alle de mulige komponenter ved oppfinnelsen, kan potensielle BCA'er isoleres ved en fremgangsmåte som er utformet bare for gjenvinning av rotaktive organismer, og undersøke de to begynnelsestester som identifiserer organismer med høyt potensial for aktivitet, og deretter undersøkes de i en serie strenge tester som identifiserer midler som deretter viser seg å være meget robuste når de undersøkes under mange forskjellige feltbetingelser. Dette representerer en hovedfordel fremfor de tradisjonelle metoder, som, som tidligere angitt, har tendens til å forkaste organismer som passerer testene ifølge denne oppfinnelse, og til å la passere meget store organismer som ved testene ifølge den foreliggende oppfinnelse viser seg å være meget inaktive eller mindre aktive enn kontrollene.

Ved fremgangsmåten ifølge denne oppfinnelse har vi isolert og vurdert fire mikroorganismer som vi finner å være spesielt aktive overfor mange forskjellige soppsykdommer som vanligvis har tilknytning til rotbrann, og oppfinnelsen innbefatter derfor også antisoppmidler som omfatter mikroorganismene av arten *Pseudomonas fluorescens*; kulturer av denne ble deponert 1. september 1989 under Budapest-traktatens betingelser i National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited, Aberdeen, Storbritannia, under adkomstnumrene 40186, 40187, 40188 og 40190.

Oppfinnelsen omfatter også en antisopp-landbruksblanding som som aktiv bestanddel inneholder én eller flere av nevnte mikroorganismer i blanding med et bærermateriale som er akseptabelt innenfor landbruksdrift.

Eksempler på de typer landbrukspreparater som kan anvendes er frøbelegningsblandinger, væsker for rot- eller jordgjennombløting og granula- eller pulverblandinger. Basismaterialene for disse er velkjente på området.

Som eksempel på screening-effektiviteten av den foreliggende oppfinnelse anvendte vi en tradisjonell in vitro-metode for sortering av ca. 7000 isolater og fant en "passerings"-mengde på rundt 20%, mens det ved fremgangsmåten ifølge den foreliggende oppfinnelse bare passerte ca. 4-5% av isolatene.

Et viktig punkt er likevel at samlingen av organismer som passerte hver av de to minimumstester ifølge oppfinnelsen, var meget like, mens den tradisjonelle agarsortering lot passere en meget uensartet samling av organismer. Noen av organismene som kunne ha blitt forkastet dersom man hadde stolt på den tradisjonelle screening-metode, viste høy aktivitet i etterfølgende screening-tester og i feltforsøk. Dette er hovedfordelen ved oppfinnelsen: begynnelsessorteringen reduserer det totale antall organismer som fordrer ytterligere screening, og en høy andel av slike som uttas for ytterligere screening, finnes senere å vise den ettersøkte aktivitet på feltet. Vi tror at grunnen er som følger. Testparametrene, f.eks. temperatur og næringssammensetning, ifølge den tradisjonelle metode, er optimalisert for fremskyndelse av veksten av mikroorganismen i agar; slike næringsstoffer fjernes i stor grad ved den barske miljømessige virkelighet ved de betingelser som den påtenkte anvendelse av mikroorganismen skjer under. Følgelig er mange av mikroorganismene som overlever denne begynnelsessortering generelt svake, kan bare overleve i det avlukkete miljø i agarkulturen og svikter deretter etterhvert som de strengere sekundære og ytterligere sorteringer begynner mer å nærme seg det virkelige feltmiljø. På den annen side vil det innenfor en gruppe isolater (og vår erfaring tyder på at dette er tilfelle) være stammer av mikroorganismer som foretrekker de feltbetingelser hvor f.eks. temperaturene er lave eller det ikke er så rikelig med næringsstoffer eller næringsstoffene har forskjellig sammensetning. Slike organismer vokser ikke godt i agartesten og ville normalt bli forkastet. Vårt utsagn er at de to sorteringer ved kjernen av vår oppfinnelse gir testmiljøer som er nærmere testbetingelsene og således gir en mer realistisk angivelse av mikroorganismens evne til å trives i det miljø som den skal anvendes i.

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en fremgangsmåte for inhibering av soppsykdom hos en plante, som omfatter at man til planten, plantens frø eller vekstmediet for planten tilfører en effektiv dose av et antisoppmiddel ifølge den foreliggende oppfinnelse.

Oppfinnelsen tilveiebringer dessuten en fremgangsmåte for beskyttelse av nyttevekstplanter mot soppinfisering, som omfatter at man til plantene, røttene eller frøene, eller til jord som omgir plantene, tilfører en fungisid effektiv dose av én eller flere enn én av nevnte *Pseudomonas fluorescens*-stammer.

Stamme NCIB 40187 ble isolert fra hveterøtter oppsamlet fra planter dyrket på et felt på en gård kjent som Badbury 2, Draycott Farm, Chiseldon, Swindon, Wiltshire, Storbritannia.

Stammene NCIB 40186 og 40188 ble isolert fra jord tatt fra et felt kjent som Stockoy Field i Jodoigne i Belgia.

Stamme NCIN 40190 ble isolert fra røttene av hvetefrøplanter fra Lower Garston-feltet, Rushall Farm, Newbury, Storbritannia.

Det følger nå en beskrivelse av isolering, karakterisering og screening av bakterie-isolatene med hensyn til aktivitet overfor flere sopparter som infiserer nyttevekstplanter. Meget store antall mikroorganismer ble isolert, identifisert og underkastet screening på den måte som er beskrevet i det følgende, idet de fire stammer ifølge den foreliggende oppfinnelse velges på grunn av sin fremragende ytelse ved screening-testene.

Isolering av mikroorganismene

Det ble tillaget et rør av dialyse-rørmateriale med lengde 35 cm og bredde 5,5 cm, med en knute laget 5-7 cm fra én ende. Fin sand ble vasket og tørket og hellt i røret til en dybde av 12 cm, og fuktet med 20 ml destillert vann. Rørene med sand ble anbrakt inne i glassrør (høyde 30 cm og diameter 7 cm) for understøttelse. Rørene ble så lukket i bunnen ved hjelp av en gummiplugg dekket med aluminiumsfolie, og i toppen med en bomullsplugg, og deretter innpakket i aluminiumsfolie. Montasjen ble autoklavert to ganger ved 121°C i 60 minutter.

En jordprøve ble oppsamlet fra mål-jordområdet og holdt ved 40% fuktighet ved 4°C til bruk, innen 2 dager etter oppsamling. Jordprøven ble siktet gjennom en 4 mm sikt og fylt i rørene til en dybde av 3 cm på toppen av sanden. Et frø (ert, hvete, sukkerroe, solsikke, mais eller soyabønne) ble sådd og dekket med jord til en

total dybde på 6 cm. Rørene ble anbragt opprett-stående i en stål-trådkurv som så ble innelukket i en plast-beholder med huller for luftutskifting og minimalisering av fordampningstap. Kurvene ble så anbragt i et vekstkammer og inkubert i 4 uker ved temperaturer på 10-24°C og med 70% relativ fuktighet i en syklus med 16 dag-timer og 8 nattetimer. Etter en fireukers inkubering ble plast-dialyserørmaterialet skåret opp med en for-sterilisert skalpell. Røttene av hver plante ble fjernet forsiktig fra jorden og sanden, og planten ble anbragt i et hvitt plasttrau. Plantenes krone- og toppområder ble avkuttet og vasket separat i sterilt vann.

De avkuttete deler ble anbragt i sterile Erlenmeyer-kolber som inneholdt 20 ml avionisert vann og et lag glassperler. Kolbene ble så rystet på en inkubator med sirkelbevegelser ved 120 rpm (omdreininger pr. minutt) i 30 minutter. Ved anvendelse av en ren løsning av rotvaskingene og rot- og kronevaskingene fra kolbene, ble det tillaget en 1:1-fortynning i steril Ringers løsning til en 10^{-3} fortynning. En porsjon på 100 μ l fra hver løsning ble så spredt ut over overflaten av tre agarmedie-plater med følgende sammensetning:

1/10 TRYPTON-SOYA-AGAR

Trypton-soyabuljong	3,0 g
Bakteriologisk agar	17,5 g
Avionisert vann	1000 ml

[Mediet ble autoklavert ved 121°C i 15 minutter]

ROTEKSTRAKT-AGAR

Friske hveterøtter	10 g
Agar nr. 3	17,5 g
Avionisert vann	1000 ml

[De friske røtter ble veiet og blandet med en liten mengde av det avioniserte vann under anvendelse av en matvareblander. Den tykke suspensjon ble så anbragt inne i en pose av fire lag småmasket musselin som så ble opphengt i det gjenværende avioniserte vann i et 2-liters begerglass og inkubert ved 20°C i 4 dager.

Musselinposen ble så fjernet og agaren tilsatt til rotekstraktet. Mediet ble så autoklavert i 15 minutter ved 121°C].

JORDEKSTRAKTAGAR

Jordprøve	10 g
Agar nr. 3	17,5 g
Avionisert vann	1000 ml

[Jorden ble veiet og anbragt i det avioniserte vann i et 2-liters begerglass. Jordsuspensjonen ble dekket og inkubert ved 20°C i 4 dager, hvorefter den ble drenert gjennom et 4-dobbelt lag av småasket musselin. Agar ble så tilsatt og mediet autoklavert ved 121°C i 15 minutter].

Det var tre paralleller for hver fortynning. Agarplatene ble inkubert ved 12°C i opptil 5 dager, hvorefter antallet kolonier på hver plate ble tellet og notert. Hvor mulig, ble det utvalgt en plate fra hver plante-, fordypnings- og agarkombinasjon som inneholdt 50 eller færre kolonier. Når dette ikke var mulig, ble det opptrukket et nettverk med 50 skjæringspunkter på platen, og det ble uttatt kolonier som var på, eller nærmest, hvert av skjæringspunktene. Således var koloniutvelgelsen fullstendig tilfeldig.

De individuelle kolonier ble utplukket fra platene under anvendelse av en steril bakterieøse og sub-dyrket på petriskåler med diameter 5 cm som inneholdt 1/10 trypton-soya-agar (1/10 TSA). Platene ble så inkubert ved 12°C i 5 dager. Isolatene ble så undersøkt med hensyn til renhet. Der hvor det var en blandet kultur ble isolatet utstrøket på 1/10 TSA-skråagar under oppnåelse av enkeltkolonier. En koloni ble valgt og sub-dyrket på 1/10 TSA. Oppsamlingen av kulturer ble oppbevart ved 4°C.

KARAKTERISERING AV MIKROORGANISMENMorfologi

De morfologiske karakteregenskaper hos mikroorganismen er som følger:

Celle morfologi: Gram-negative staver

Kolonimorfologi:

- NCIB 40186: Varmhvit, rund, jevn, hel, svakt konveks, bløt, blank, halvt gjennomskinnelig, diameter 1,5-2 mm.
- NCIB 40187: Varmhvit, rund, jevn, hel, oppstående, bløt, blank, halvt gjennomskinnelig, diameter 1 mm.

NCIB 40188: Varmhvit, rund, jevn, hel, svakt konveks, bløt, glatt, halvt gjennomskinnelig, diameter 1,5-2 mm.
 NCIB 40190: Varmhvit, rund, jevn, hel, flat, bløt, blank, halvt gjennomskinnelig, diameter 1 mm.

Veksttemperatur:

Alle stammer 37°C +ve

41°C -ve

45°C -ve

Fluorescens Alle stammer +veKatalysator Alle stammer +veOksydase Alle stammer +veFermentativi glukose Alle stammer -veVED HURTIGTEST (API)

	NCIB	40186	40187	40188	40199
Nitrat-reduksjon		-	-	-	-
Indol-produksjon		-	-	-	-
Syre fra glukose		-	-	-	-
Arginin-dehydrolase		+	+	+	+
Urease		-	-	-	-
Æskulin-hydrolyse		-	-	-	-
Gelatin-hydrolyse		+	+	+	+
β-galaktosidase		-	-	-	-
Glukose-asimilasjon		+	+	+	+
Arabinose-assimilasjon		+	+	+	+
Mannose-assimilasjon		+	+	+	+
Mannitol-assimilasjon		+	+	+	+
N-acetylglukosamin-assimilasjon		+	+	-	+
Maltose-assimilasjon		-	-	-	-
Glukonat-assimilasjon		+	+	+	+
Kaprat-assimilasjon		+	+	+	+
Adipat-assimilasjon		-	-	-	+
Malat-assimilasjon		+	+	+	+
Citrat-assimilasjon		+	+	+	+
Fenlacetat-assimilasjon		-	-	-	+
Cytokrom-oksydase		+	+	+	+

PRIMÆRSCREENINGJord-petriskål-screening

Petriskåler (5 cm) ble fylt med 10 ml potet-dekstroseagar (PDA). Agarplugger (5 mm) fra en 7 dager gammel kultur av *Pythium ultimum* dyrket ved 20°C ble anbragt i sentrum på PDA-agaren. Platene ble inkubert i 5 dager ved 20°C, og i løpet av denne tid koloniserte *P. ultimum* platen.

Leirjord av typen Minster Mendip ble autoklavert ved 120°C i 60 minutter. Til denne ble det tilsatt hvetekim (1 vektprosent) og det ble blandet godt. Ca. 8 g jord ble anbragt i hver petriskål slik at det dekket *Pythium*-laget.

Testbakteriene ble dyrket i 1/10 TSB eller på 1/10 TSA-plater i 48 timer ved 12°C.

Til hver petriskål ble det tilført 2 ml av kulturen; det ble tillaget 2 paralleller av platene.

Behandlinger:

- 1/10 TSB alene
- Metalaksyl (100 ppm)
- Testorganisme
- 1/10 TSB tilsatt til jorden på PDA ikke inokulert med *Pythium*

Platene ble inkubert i 4 dager ved 10°C.

Aktiviteten, bedømt etter en skala på 0-3, ble valgt på basis av fullstendig inhibering av soppvekst i jorden.

FUSARIUM-POTETSCREENING

En steril filterpapierskive (diameter 9 cm) ble grundig fuktet med vann og anbragt på bunnen av en steril petriskål. To plater ble tillaget for hver behandling.

Fusarium-kulturer (*Fusarium sambusinum*, *Fusarium culmorum* og *Fusarium moniliforme*) ble dyrket på potet-dekstroseagar i 14 dager ved 20°C i lys for frembringelse av sporer. Sporene ble så suspendert i steril saltløsning (0,85%) og justert til en transmisjon på 20% på et spektrofotometer ved 420 nm.

En halv bakterieøse med bakterier dyrket på næringsagar

(Oxoid) i 24 timer ved 20°C ble suspendert i 2,5 ml steril salt-løsning. Captan i en konsentrasjon på 2,0 g/l ble tillaget som kontroll. Saltløsning alene ble også anvendt som kontroll.

Fusarium-suspensjon (50 μ l) ble anbragt i et sterilt mikrosentrifugerør, ett rør for hver behandling.

En potetskive med tykkelse under 10 mm, gjennom hvilken det var blitt skåret fire brønner under anvendelse av en korkbor med diameter 10 mm, ble anbragt i hver petriskål. Overflaten av potetskiven ble sterilisert med etanol og tørket med sterilt filterpapir. Skivene ble anvendt innen 30 minutter etter skjæring (eller 60 minutter hvis de ble holdt ved 4°C).

En 50 μ l prøve av suspensjonen av Fusarium-sporer (10^6 sporer/ml) ble anbragt i tre av de fire brønnene i en potetskive. En prøve av bakteriesuspensjonen (50 μ l, ca. 10^8 celler pr. ml) ble blandet med Fusarium-suspensjonen i én av de tre brønner, og benomyl i en konsentrasjon på 100 ppm (deler pr. million) i en annen, og en tredje brønn tjente som ikke-inokulert kontroll.

Petriskålene ble lukket med lokk og inkubert i 3 dager ved 20°C.

Nivået av angrepet vev ble bestemt ved en subjektiv bedømmelse etter en skala på fra 0 til 3.

SCREENING MOT PHOMA BETAE

Stykker av sukkerroe, 2,5 x 2,5 x 1,5 mm, ble skåret ut av det indre av roten og fuktet med ca. 13 ml sterilt vann i en plastbeholder.

En prøve av en kultur av Phoma betae, med eller uten en prøve av den antatte antisopp-mikroorganisme, ble hellt på overflaten, og sukkerroe-stykkene ble inkubert i 3 uker.

Ved slutten av inkuberingsperioden ble sukkerroeprøvene bedømt med hensyn til råte.

SUKKERROE/JORD-SCREENING

Naturlig jord som var kjent for å forårsake "rotbrann" hos sukkerroer, ble brakt til en fuktighet på 45%. Nakne sukkerroefrø og frø belagt med testbakterier ble sådd i jorden. Prøvene ble så inkubert i 10 dager med belysning i 12 timer i døgnet ved 15°C.

Bakterienes antisopp-effektivitet ble bedømt på basis av antallet frøplanter som kom opp, sammenliknet med kjemisk bekjempelse med Tachigaren/TMTD.

SEKUNDÆRSCREENING

For testing av effektiviteten av den valgte mikroorganisme ble det anvendt to sopptyper: *Pythium ultimum* og *Rhizoctonia solani*.

Kulturer av *P. ultimum* og *R. solani* ble dyrket på PDA-plater i 7 dager ved 20°C.

En blanding av 200 g sølvsand, 5 g maismel, 4 g Beemax hvetekim og 40 ml vann ble autoklavert ved 120°C i 20 minutter og deretter anbragt i en kolbe og inokulert med 1/4 av en plate av *Pythium*. Det samme substrat, men uten maismelet, ble anvendt for *Rhizoctonia*.

Kolbene ble inkubert ved 20°C i 7 dager.

Fortynningsserier

Innholdet av hver kolbe med *Pythium ultimum* ble blandet med fin sand til en sluttvekt på 300 g.

En kolbe med *Pythium* i 8 liter Mendip Minster-leirjord = 2 normal (2N).

Dette fortynnes med ren Mendip-leirjord til ytterligere fortynninger som fordres. Isolater ble normalt undersøkt ved screening mot *Pythium* ved N/8 og N/32 ved 12-15°C.

3/4 kolbe av *Rhizoctonia solani*-inokulum i 6 liter Mendip Minster-leirjord = normal.

Konsentrasjon ved N/4 og N/16 ble anvendt ved screening-undersøkelsen.

Prøven ble utført i 7,6 cm pottes, og pottene var fylt til 3/4 med infisert jord. Fem erter ble sådd i hver potte og dekket med ren jord. 35 ml vann eller bakteriesuspensjon ble tilsatt under gjennombløting av hver potte. Fem parallelle pottes ble tillaget for hver behandling. I BCA-undersøkelsene ble bakteriene dyrket i 48 timer ved 20°C i 1/10 TSB. Hele suspensjonen (35 ml) ble tilsatt til pottene. Kontrollene var normalt 1/10 TSB og kjemikalie. Pencycuron ble tilsatt som en gjennombløtningsdose i

konsentrasjoner på 10, 100 eller 200 ppm til Rhizoctonia-prøvene og metalaxyl som gjennombløtningsdose til Pythium-prøvene i en konsentrasjon på 100 ppm.

Plantene ble dyrket for undersøkelse av *R. solani* i 7-14 dager ved 20-25°C og Pythium ved 12-15°C i 14 dager. Frøplanteoppkomsten ble kontrollert ukentlig. Plantene ble vannet daglig. Det ble spesielt passet på at jorden ble holdt fuktig under forsøkene, siden begge sykdommer påskynder rotbrann.

SCREENING MOT PHYTOPHTHORA MEGASPERMA

En plugg med diameter 5 mm tatt fra en platekultur av *P. megasperma* ble dyrket på en plate med diameter 9 cm på V-8-medium i 13 dager ved 25°C. V-8-medium har følgende sammensetning:

V-8 Campbell-saft	180 ml
CaCO ₃	2,7 g
Destillert vann	720 ml
Difco-agar	13,5 g

[Komponentene, bortsett fra agaren, ble blandet og oppvarmet til dampvarme i 30 minutter, filtrert, pH-justert til 7,2, agaren tilsatt og mediet sterilisert ved 120°C i 20 minutter.]

Fuktig hirse (50 g pluss 20 ml destillert vann) ble sterilisert to ganger ved 110°C i 45 minutter. En 1/4 *P. megasperma*-plate ble anbragt opp ned på overflaten av hirsens og inkubert i mørke i 28 dager ved 25°C.

Den *P. megasperma*-infriserte hirse (som veide 22,5 g) ble blandet grundig med sterilisert jord (1477,5 g) og vann (112,5 g) i en blandedanordning. Den anvendte jord var en 1:1:1-blanding (på volumbasis) av sølvsand, åkerjord med pH 7, og torv, som var blitt sterilisert ved 100°C i 1 time.

En mengde på 500 g av den infiserte hirse/jord-blanding ble innveid i Leonard-krukker, som så ble dekket med plastlukkeplater til bruk. Bunnvannreservoaret i Leonard-krukkene ble fylt med 100 ml destillert vann.

Det ble laget fire plantehull i overflaten av hirse/jord-blandingen, og i hvert av disse ble det sådd en soyabønne (c.v. Azzurra), og denne ble dekket med blandingen som omga den.

Kulturer av testorganismen ble preparert på næringsagarplater dyrket ved 28°C i 24 timer, og i 250 ml NB-kolber (150 ml NB) dyrket i 24 timer ved 28°C. En prøve på 75 ml av kulturen ble sentrifugert ved 8000 rpm (omdreininger pr. minutt) i 5 minutter ved 20°C. Supernatanten ble kastet, en ytterligere 75 ml prøve tilsatt, dette ble sentrifugert på nytt og supernatanten ble kastet igjen. Klumpen som var tilbake i sentrifugerørene ble vasket gjentatte ganger med 5 ml mengder av saltløsning (9,2 g/l). Til slutt ble klumpet dispergert til suspensjon i 150 ml saltløsning.

En injeksjon med 30 ml av saltsuspensjonen ble utført i hver av Leonard-krukkene fra en 60 ml sprøyte.

For sammenlikning med kjemiske midler ble 30 ml prøver av en løsning på 285,5 g metalaxyl 35% (varemerke APRON) i 500 ml destillert vann injisert i Leonard-krukkene, som kontroll.

Ikke-infiserte kontroller ble også opprettet under anvendelse av prøver av ikke-infisert hirse/jord-blanding.

Man fikk så frøene til å vokse i et vekstkammer ved 20±2°C under belysning med 17-17.000 lux. Bedømmelsen ble basert på prosentvis oppkomst sammenliknet med kjemisk kontroll.

FUSARIUM CULMORUM-SCREENING

En kultur av *Fusarium culmorum* ble dyrket i PDA i 10 dager ved 20°C for at det skulle dannes sporer. Sporene ble oppsamlet og tellet til et konsentrasjonsområde på fra 10^4 til 10^8 sporer pr. ml. Av denne forrådiskultur ble det tilsatt 5 ml til 100 g hvete frø i en flaske som så ble rotert over natten ved 10°C.

En prøve av de infiserte frøene ble lagt i en blanding av testbakterien og sølvsand i 60 minutter før utsåing, under påføring av et belegg på ca. 10^6 celler pr. frø. En andre prøve ble behandlet med benomyl (100 ppm) som kjemisk kontroll.

100 frø ble sådd i en torvbasert kompost i et frøplantetrau i en dybde på 2 cm. Komposten ble vannet ved begynnelsen av prøven, anbragt ved 20°C i 2 uker og vannet igjen den femte dag etter såing. Etter denne begynnelsesvanning av komposten for befordring av spiring av frøene, fikk komposten tørke for befordring av utvikling av sykdomsangrepet.

Frøplantene ble kontrollert med hensyn til etablering og sykdomsutvikling. Sykdomssymptomene ble bedømt etter en skala på fra 0 (ingen symptomer) til 4 (alvorlig angrepet).

RESULTATER

Ca. 7000 jordbakterieisolater ble undersøkt ved screening ved testene beskrevet ovenfor. Tabell 1 nedenfor oppsummerer resultatene av disse tester. Tallene i kolonnene er i en skala på fra 0 (ingen antisoppeffekt) til 3 (ingen merkbare sykdomssymptomer). I tabellen er det også inntatt et sammenliknings-eksempel med en typisk ineffektiv bakteriestamme, betegnet 53/87.

TABELL 1

PRIMÆR-SCREENING NCIB	40186	40187	40188	40190	53/87
Fusarium culmorum	1	2	0	2	1
Fusarium moniliiforme	1	1	0	1	1
Fusarium sambusium	0	1	0	0	1
Pythium ultimum	2	3	2	2	0
Aphanomyces	3	1	0	2	0
Phoma betae	2	0	3	1	0
Sukkerroe/jord	3	2	2	3	0
SEKUNDÆR-SCREENING NCIB	40186	40187	40188	40190	53/87
Rhizoctonia solani	0	3	3	0	0
Pythium ultimum 15°C	3	3	3	0	0
Pythium ultimum 24°C	3	2	2	2	0
Fusarium culmorum	2	2	2	2	0
P. megasperma	2	1	1	1	0

FELTPRØVEDATA 1989

Stammene som viste seg mest lovende ved primær- og sekundærscreening ble utvalgt for feltprøver som biologiske bekjempelsesmidler overfor "rotbrann"-sykdom på erter og sukkerroer.

Fig. 1 illustrerer resultatene oppnådd med stamme NCIB 40186 med hensyn til rotbrann hos erter. Denne prøve ble utført i Storbritannia. Bekjempelse oppnådd med denne stamme var ca. 80% av bekjempelsen oppnådd ved kjemisk behandling med metalaxyl (APRON, varemerke). Stamme NCIB 40187 var i høy grad ineffektiv ved denne prøve.

Fig. 2 og 3 viser resultatene av feltprøver med hensyn til sukkerroer under anvendelse av stammene NCIB 40186 og 40190. Disse prøver ble utført i Belgia. Seks feltsteder ble valgt. Tre steder (1, 3 og 6) ble sådd med sukkerroe i mars, og de resterende tre steder ble sådd i mai. Fig. 2 viser resultatene ved den første telling som ble utført 3 uker etter såing, og fig. 3 viser resultatene etter 6-8 uker etter såing.

Disse resultater viser sammenfattet at rotbrann hos erter, forårsaket av *Pythium ultimum*, reduseres ved anvendelse av stamme NCIB 40186 i et nivå som kan sammenliknes med det som oppnås med kjemisk behandling med metalaxyl. Sukkerroe-resultatene viser forbedret frøplanteoppkomst ved anvendelse av stammene NCIB 40186 og 40190 sammenliknet med ubehandlede kontroller på alle seks steder. På tre steder var frøplanteoppkomst i nærvær av stammene sammenliknbare med det som ble oppnådd med metalaxyl.

FELTPRØVEDATA FOR 1990

I løpet av 1990 er det blitt utført feltprøver med mikroorganismene NCIB 40186 og 40190 med hensyn til deres potensial for inhibering av *Pythium* spp. Prøvene ble utført i USA, Belgia og Frankrike, og resultatene vil bli vist nedenfor. For prøveformålene ble mikroorganismen tilført som et frøbløtebad fulgt av tørking i sand når det gjaldt de europeiske undersøkelser, og som et gummi/torvpreparat når det gjaldt USA. Ytterligere prøver fortsetter i andre deler av verden hvor "rotbrann"-sykdommer er endemiske, f.eks. når det gjelder grønnsakavlinger i Malaysia.

Skjønt vi ikke er istand til å vise resultatene fra prøvene rundt om i verden, ganske enkelt på grunn av at prøvene ennå ikke er fullstendige og, som man vil forstå, ikke kan fremskyndes på grunn av sesongbegrensningene for landbruksmetoder, er begynnelses-antydninger fra våre forsøkspersoner gunstige, og således viser disse spesielle mikroorganismer i hvertfall stort potensial for et kommersielt biologisk bekjempelsesmiddel. Ytterligere utprøving av de andre mikroorganismer nevnt i det foreliggende fortsetter i laboratoriet og i vekstkamre i henhold til normal praksis med hensyn til effektivitet og sikkerhet både for mennesker og miljøet. Resultater som for tiden er tilgjengelige bekrefter det potensial som er funnet tidligere, og som er rapportert i det foreliggende.

Stammene NCIB 40186 og 40190 ble testet overfor rotbrann hos sukkerroer i prøver på ni jordstykker i Belgia og Frankrike. Under såingen tidlig om våren var været meget varmt og tørt, hvilket forårsaket endel problemer med hensyn til sykdomsutvikling av rotbrann hos sukkerroer. På hvert av test-jordstykkene ble det sådd totalt 200 frø. Inntil dags dato er det tilgjengelig resultater fra ni av prøvene.

BELGISKE OG FRANSKE PRØVER 1990

Testavling: Sukkerroer

Kjemisk kontroll: Tachigaren/TMTD

Prøve nr.	Antall frø av 200 som kom opp			
	Ubehandlet kontroll	Kjemisk behandling	NCIB 40186	NCIB 40190
1	93	125	130*	114
2	118	141*	124	127
3	118	157*	146*	138*
4	107	139*	131*	122*
5	120	150*	128	130
6	84	116*	111*	114*
7	135	153*	143	138
8	119	148*	141	135
9	134	155*	144	144

* = LSD med 5% sannsynlighet

FRANSKE PRØVER 1990

Forsøksavling: Erter

Kjemiske kontroller: som vist nedenfor

Antall planter angir middelantallet av planter som kom opp på en 5 meter lang rille 22 dager etter behandling.

Kolonne 2 i tabellene gir antallet planter som kom opp ut fra 200 frø 22 dager etter såing.

Bokstavene etter tallene viser statistisk signifikans. Det er ingen signifikant forskjell ved 5% sannsynlighetsnivået mellom nedtegnete verdier med en felles bokstav.

KONTROLLBEHANDLINGER

Tester utført i normal feltjord, uten noe tilsatt patogen.

Behandling	Antall oppkommet
Ubehandlet frø	172,58 AC
NCIB 40186 - 107 celler pr. frø	184,75 A
APRON - 30 g a.i./100 kg frø	171,50 AC
RIDOMIL 2E metalaxyl-furebløting	181,00 A
Rent frø 100 celler/frø	176,00 AC

TESTBEHANDLINGER

Patogen (Pythium) ble tilsatt i en mengde på 200 g/meter rad.

Behandling	Antall oppkommet
Ubehandlet frø	111,25 I
NCIB 40186 - 107 celler pr. frø	144,75 DG
APRON - 30 g a.i./100 kg frø	157,25 BCDF
RIDOMIL 2E metalaxyl-furebløting	164,215 AD
Rent frø 100 celler/frø	119,88 HI

CALIFORNISKE (USA) PRØVER 1990

Test/avling: erter

Test-patogen: Pythium 30 g/meter rad.

Behandling	% oppkommet
Intet tilsatt patogen, ingen behandling	93,13 AB
Patogen + NCIB 40186 - 107 celler/frø	75,31 BCD
Patogen + rent frø - 100 celler/frø	51,56 EF
Patogen + APRON-30 g a.i./100 kg	92,81 AB

MISSISSIPPI (USA) PRØVE 1990

Test/avling: mais

Test-patogen: Fusarium (i) 10 g/meter rad

(ii) 30 g/meter rad

Oppkomst er oppført i % etter 15 dager etter såing.

Behandling	% oppkommet
Intet tilsatt patogen, ingen behandling	65,833 C
Intet tilsatt patogen, NCIB 40186 - 107 celler/frø	67,917 C
Intet tilsatt patogen, CAPTAN som frøbehandling	69,583 BC
Patogen (i), ingen behandling	51,250 D
Patogen (i), + NCIB 40186 - 107 celler/frø	80,000 AB
Patogen (ii), ingen behandling	69,375 BC
Patogen (ii), + NCIB 40186 - 107 celler/frø	82,708 A
Patogen (ii), + CAPTAN som frøbehandling	63,958 C

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for screening av et antatt antisoppmiddel ved vurdering av den inhiberende effekt av middelet på soppangrep, i to undersøkelser, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

den første undersøkelse omfatter preparering av et mycelium av en patogen organisme av *Pythium* spp i et lag av dyrkningsmedium, anbringelse av et lag av steril jord på dyrkningslaget, tilsetting av en porsjon av et antatt antisoppmiddel til jordlaget, inkubering av forsøksenheten og vurdering av den inhiberende effekt av antisoppmiddelet på veksten av den patogene organisme, og

den annen undersøkelse omfatter inokulering av en jordprøve med et patogent sopp-rotbrann-kompleks, såing av en plante som er utsatt for infisering med soppen, i den soppinfiserte jord, påføring av en porsjon av et antatt antisoppmiddel på jorden, idet frøet får spire og en plante får vokse fra dette, og vurdering av den inhiberende effekt av soppmiddelet på plantens helse, sammenliknet med en ikke-infisert kontroll.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t planten som er utsatt for infisering med rotbrannsykdoms-komplekset, er sukkerroer.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d a t det potensielle antisoppmiddel er en mikroorganisme.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d a t mikroorganismen er en rot-koloniserende mikroorganisme.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den rotkoloniserende mikro-organisme isoleres fra en jordprøve ved en fremgangsmåte som omfatter at det i en forseglbar beholder anbringes et lag av fuktig steril sand, jordprøven anbringes i fuktig tilstand oppå dette, og et frø av en plante som er utsatt

for den aktuelle sykdom, såes i jordprøven, beholderen forsegles, beholderen anbringes under miljømessige betingelser som bidrar til sykdoms-utviklingen, frøet får spire og røttene får strekke seg fra jordlaget inn i sandlaget, røret dissekteres i lengderetningen gjennom begge lag, røtter uttas kun fra sandlaget og mikro-organismer isoleres fra de uttatte røtter.

6. Fremgangsmåte ifølge hvilke som helst av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d at et middel som viser sykdomsinhibering i begge de nevnte undersøkelser, undersøkes ytterligere ved screening med hensyn til inhibering av sopp-infeksjon i én eller mer enn én ytterligere undersøkelse valgt blant:

- (a) infisering av sukkerroer med *Aphanomyces cochlioides* ved en temperatur på fra 12 til 15°C,
- (b) infisering av erter med *Pythium ultimum* ved en temperatur på fra 12 til 15°C,
- (c) infisering av erter med *Pythium ultimum* ved en temperatur på fra 24 til 27°C,
- (d) infisering av erter med *Rhizoctonia solani* ved en temperatur på fra 24 til 27°C,
- (e) infisering av hvete med *Fusarium culmorum* ved en temperatur på fra 18 til 21°C,
- (f) infisering av soyabønner med *Phytophthora megasperma* ved en temperatur på fra 20 til 24°C,
- (g) infisering av potetskive med *Fusarium moniliforme* ved en temperatur på fra 20 til 24°C,
- (h) infisering av en potetskive med *Fusarium sambusinum* ved en temperatur på fra 20 til 24°C, og
- (i) infisering av sukkerroer med *Phoma* spp ved en temperatur på fra 15 til 19°C.

7. Antisoppmiddel, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter mikroorganismen *Pseudomonas fluorescens*, hvorav en kultur ble deponert 1. september 1989 under betingelsene ifølge Budapest-traktaten, hos National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited, Aberdeen, Storbritannia, under adkomstnummer 40186.

8. Antisoppmiddel, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter mikroorganismen *Pseudomonas fluorescens*, hvorav en kultur ble deponert 1. september 1989 under betingelsene ifølge Budapest-traktaten, hos National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited, Aberdeen, Storbritannia, under adkomstnummer 40187.

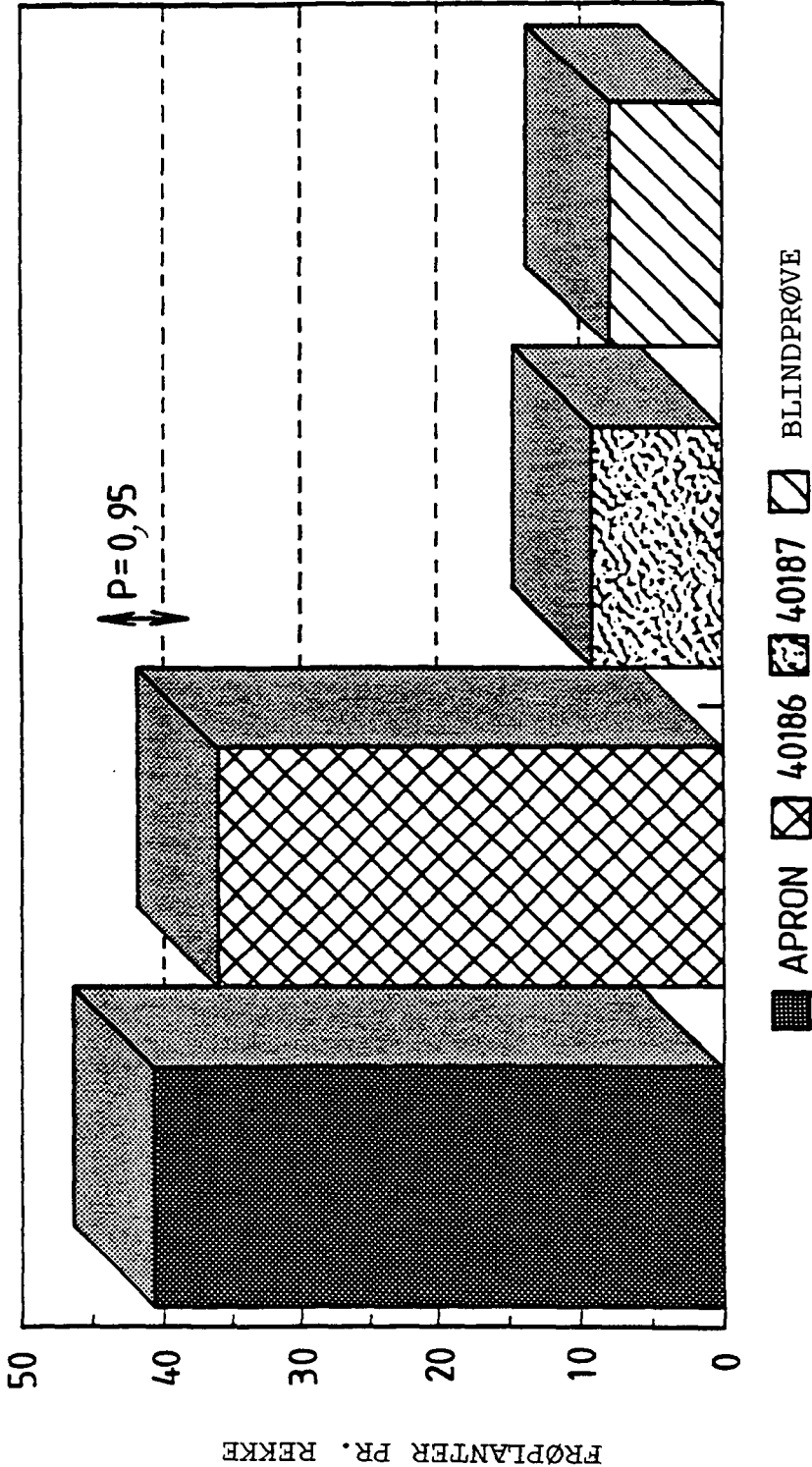
9. Antisoppmiddel, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter mikroorganismen *Pseudomonas fluorescens*, hvorav en kultur ble deponert 1. september 1989 under betingelsene ifølge Budapest-traktaten, hos National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited, Aberdeen, Storbritannia, under adkomstnummer 40188.

10. Antisoppmiddel, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter mikroorganismen *Pseudomonas fluorescens*, hvorav en kultur ble deponert 1. september 1989 under betingelsene ifølge Budapest-traktaten, hos National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited, Aberdeen, Storbritannia, under adkomstnummer 40190.

11. Antisopp-landbruksblanding, k a r a k t e r i s e r t v e d at den som aktiv bestanddel inneholder et antisoppmiddel ifølge hvilket som helst av kravene 7-10, i blanding med et bærer-materiale som er akseptabelt til landbruksanvendelse.

12. Fremgangsmåte for inhibering av soppangrep på en plante, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter at en effektiv dose av et antisoppmiddel ifølge hvilket som helst av kravene 7-10, tilføres til planten, til et frø av denne før såing, eller til et vekstmedium hvor planten vokser eller skal dyrkes.

FIG.1 PYTHIUMFORSØK



2/2
FIG. 2 FELTFORSØK

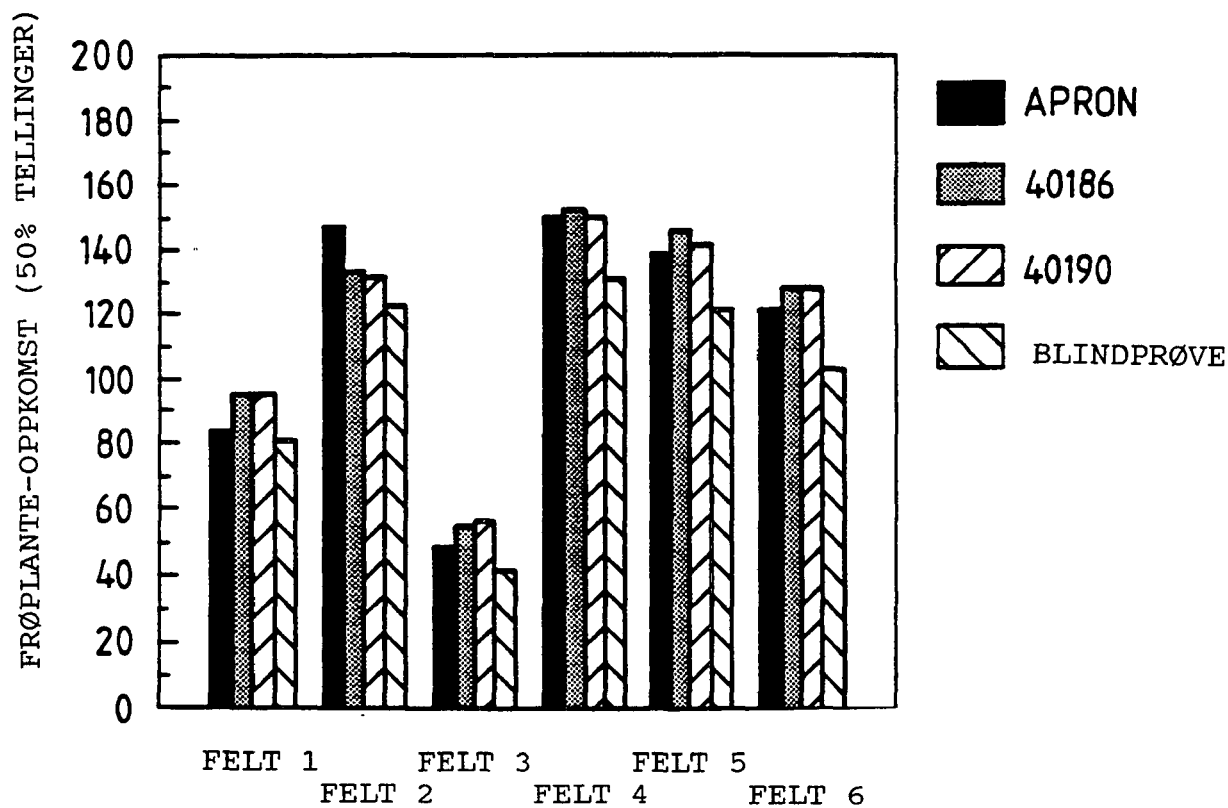


FIG. 3 FELTPRØVER

