

Till: info@ekhagastiftelsen.se

2018-02-21

## Årsrapport till Ekhagastiftelsen

Diarienummer: 2016-58

Projekttitel: "Earthworm interaction with plant diseases, potential agents for biological control in agriculture. Case: Fusarium Head Blight in Uruguay"

Kontaktperson: Gabriella Jorge,  
gjorge@fagro.edu.uy,  
+598 99 495 334

### » Bakgrund, syfte, teori och metod

Fusarium och andra jordburna skadesvampar orsakar stora förluster i jordbruket i hela världen genom minskade skördar och kvalitetsförsämring. De bildar också svampgifter (huvudsakligen mykotoxinen DON) som är hälsofarliga för människor och husdjur. Fusarium överlever på växtrester på markytan och i jorden i väntan på att infektera lämpliga värdväxter. Bekämpningen sker främst med kemiska fungicider som är skadliga för miljön, bl.a. giftiga för daggmaskar, och riskabla för dem som handhar medlen. Resistenta växtsorter och anpassade växtföljder har också betydelse för bekämpningen. För miljövänligare jordbruk bör alla möjligheter till biologisk bekämpning och nyttjande av ekosystemtjänster provas.

Studier har visat att daggmaskar kan skydda växter genom att påverka växtsjukdomar, särskilt Fusarium-förekomsten har visats minska i veteodling som ympats med *Fusarium graminearum*, p.g.a. daggmaskaktivitet. Studierna gjordes vid SLU i Uppsala med professor Jan Lagerlöf som ansvarig med europeiska daggmaskarter. I det forskningsprojekt som vi nu söker medel för vill vi fördjupa studierna av samspelet mellan daggmaskar och *F. graminearum* i veteodling i Uruguay.

I Uruguay har *F. graminearum* orsakat förluster på upp till 50 % av veteproduktionen och det är den växtpatogena svamp som ger störst skador på veteodlingen i landet. Att utnyttja biologisk bekämpning av växtsjukdomar är särskilt viktigt i länder som Uruguay där man har problem med minskande bördighet och jorderosion och därför infört plöjningsfri odling. Denna form av jordbruk har många fördelar för miljön såsom minskad erosion och ökning av mängden organiskt material i jorden som binder kol, dvs. minskade utsläpp av växthusgasen koldioxid till atmosfären. Samtidigt kan jordburna växtsjukdomar uppföras och den plöjningsfria odlingen har medfört ökad användning av kemiska fungicider. Därför är det viktigt att öka kunskaperna om daggmaskarnas samspel med patogena mikroorganismer och undersöka hur möjligheterna till minskning av skadesvampar och växtsjukdomar genom daggmaskarnas aktivitet kan utnyttjas i miljöanpassad och hållbar jordbruksproduktion.

Projektets övergripande mål är att öka kunskapen om den lokala daggmaskfaunan för att kunna dra nytta av de ekosystemtjänster som daggmaskarna kan erbjuda, särskilt när det gäller biologisk bekämpning. Forskningen inom detta område kommer att ge relevant information för att utveckla och införa mer miljövänliga jordbruksmetoder där daggmaskarnas ekosystemtjänster tas till var.

Den total projektperioden är två år. Under det första året har provtagning i jordbruksmark utförts för inventering av daggmaskar i både ekologiska och konventionella vetefält i Uruguay genom morfologisk och molekylär identifiering av arter. Laboratorieförsök ska utföras under det andra året. I laboratorieförsök med tillförsel av skörderester ska daggmaskars inverkan på skadesvampen *F. graminearum* undersökas i behandlingar med och utan daggmaskar av olika arter som har olika ekologi och näringsval. Slutligen genomförs labbförsök där vi kvantifierar effekten av vissa fungicider på överlevnad, tillväxt och reproduktion hos de valda daggmaskarterna.

## » Information om vad som har genomförts under år 2017

Daggmaskar av familjen Lumbricidae och flera exotiska (införda) arter av släktet *Amyntassom* ursprungligen kommer från Europa och Asien har med människans hjälp invaderat andra kontinenter och verkar där vara bättre konkurrenter än inhemska daggmaskar, särskilt i störda ekosystem såsom intensiva jordbruksgrödor. Vår forskning om biologisk mångfald i jordbruksmark i Uruguay har registrerat 19 daggmaskarter hittills, varav mer än hälften är exotiska. Vi tog prov iväxtföljder med vete i Montevideo och Paysandú och tog som kontroll prover i jord på mindre störda platser i närheten. Daggmaskarterna identifierades genom att kombinera morfologisk taxonomi med molekylära metoder.

Alla vuxna exemplar av daggmaskar mättes (längd och bredd); klassificerades med morfologisk taxonomi till artnivå, när det var möjligt, och kategoriserades som inhemska eller exotiska, baserat på listor och beskrivningar av de daggmaskar som har hittats i Uruguay (Grosso och Brown, 2007), och efter de tillgängliga bestämningsnycklar och taxonomiska beskrivningar som finns (Andersen, 1997; Reynolds, 1996; Righi, 1979; Sims och Gerard, 1985). I avsaknad av en specifik nyckel för Uruguay användes dessa nycklar inte strikt, utan snarare som en guide.

Arters identitet bekräftades genom molekylära metoder genom amplifiering och sekvensering av mitokondriell cytokrom c oxidasi (COI) DNA-region (Barcoding). Vävnadsprov för DNA togs från den bakre delen av en representativ daggmask för varje morfologisk grupp, som inte var fixerad i formaldehyd, men bevarades i vattenfri etanol 20°C. Ett standard-DNA-extraktionsprotokoll följdes, som är en modifierad version av Dellaporta et al (1983) (Jorge-Escudero et al., in prep.). COI-fragment amplifierades med primärerna LCO1490 och HCO2198 (Folmer et al., 1994), med ett standardstreckkodningsprotokoll som är anpassat (Huang, 2007) baserat på George G. Browns förslag (*pers. Comm.*) (Jorge Escudero et al., in prep.). PCR-reaktioner sändes till Macrogen® (Korea) för amplifikation, rening och sekvensering, och bearbetades med hjälp av BLAST-N-algoritmen (Altschul et al., 1990) för att söka arter med matchande sekvens.

Preliminära laboratorieförsök har utförts under detta året, men bör repeteras under andra året.

Daggmaskar kan förbättra växthälsan direkt eller indirekt, genom inverkan på mark, mikroorganismer eller växtimmunsystem. Särskilt har tre lumbricidmaskararter visat sig avsevärt minska *Fusarium* spp. på vetehalm, den växtpatogen som är ansvarig för en av de största sjukdomarna som påverkar veteproduktion och spannmål i allmänhet, Fusarium Head Blight. För att klargöra huruvida några Uruguayanska daggmaskarter skulle kunde uppfylla en jämförbar roll valde vi två arter att testa i ett multifaktoriellt experiment. De utvalda arterna var: *Lumbricus friendi*, anecisk, exotisk, liknande *L. terrestris*, men mindre; och *Glossoscolex uruguayensis*, endogeiska, inhemska, av liknande storlek som *Aporrectodea caliginosa*. Vi la daggmaskarna i cylindrar med 2kg jord och vetehalm med *Fusarium* på ytan (mikrokosm) och incuberade 6 veckor. Vi jämförde hur dessa daggmaskar påverkade halmen på ytan och *Fusarium* mängden i halmen som blev kvar, jämförde med kontroll utan daggmaskar. Vi verifierade att *L. Friendi* hade mätbar effekt på halmen, men kunde inte verifiera effekten på *Fusarium*, därför bör experimentet repeteras.

## » Delresultat

Totalt hittades 16 daggmaskarter i de provtagna jordbruksmarkerna och referensområdena, varav tre inte tidigare beskrivits för Uruguay. Det kan hända att en art av de här tre egentligen är tvåolika arter, och det blir därför eventuellt totalt 4 nya arter. Detta bör verifieras med hjälp av internationella taxonomer, såsom Samuel James. Tolv exotiska arter hittades, åtta av dessa var endogeic (lever och söker föda nere i jorden), två anecic (lever i jorden men hämtar föda på markytan) och två epigeic (ytligt levande), medan fyra var inhemska endogeic. Detta är den första rapporten av främmande daggmaskarter i Paysandú, med förekomsten av *Aporrectodea caliginosa*, den mest förekommande och utbredda arter i denna studie. Förhållandet mellan exotiska och inhemska varierade mellan platser och mellan störda jordar och kontroller, med den högsta andelen exotiska arter i Montevideo och större andel inhemska i Paysandu. Dominansen av införda exotiska arter i Montevideoområdet kan troligen tillskrivas närheten till Montevideos hamn som är den viktigaste

inkörsporten för invandring från Europa och Mellanöstern. I Montevideo var exotiska:inhemska-kvoten högre i jordbruket än i kontrollområdena, medan detta mönster inte observerades i Paysandú. GenBank hade registrerade sekvenser för tio av de exotiska arterna och en av de inhemska, vilket visar behovet av att fortsätta denna forskningslinje och bidra till sekvens baken (GenBank) av korrekt identifierade inhemska arter, för att underlätta tydlig förståelse av den biologiska mångfalden av dagmaskar i Uruguay.

Resultaten har bidragit till min Doktorsavhandling, vilken jag tänker lägga fram för disputation under året 2018. Vi har dessutom skickat manuskript till *Aplied Soil Ecology*, *Agrociencia* (Uruguay) och *Revista Brasileira de Agroecologia*, vilka är under revision.

## » Inriktning och plan för kommande år

Förutom att genomföra experiment, kommer vi under det andra året att skriva fler artiklar baserade på resultaten från experimenten och skicka dessa till internationella tidskrifter för publicering.

Jag ska möta dagmaskstaxonomen Dr. Samuel James vid en Dagmaskstaxonomikurs i Argentina i slutet på februari för att verifiera artbestämningen av de exemplar vi är osäkra på.

Experimenten vi ska göra är det följande:

1. Mikrokosmexperimentet ska repeteras för att verifiera dagmaskarnas effekt på *Fusarium* och vetehalm på markytan.
2. Det är också intressant att veta hur fungiciderna som används i spannmålsgrödor påverkar dagmaskarna. Syftet med detta experiment är att utvärdera (1) subletala effekter på *Eisenia fetida* av två kommersiella fungicider som vanligen används för kontroll av vetefusarios; och (2) akut dödlighet av en kommersiell fungicid på *G. uruguayensis* (inhemsk art) och *E. fetida* (referensarter).

## » Referenslista:

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403–410.
- Andersen, C., 1997. Regnorme. *Natur og Museum*, 36(4), 35pp.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(4):19–21.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994 DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.
- Grosso E.G. y Brown GG. 2007. Biodiversidad y ecología de las lombrices de tierra en el Uruguay. . En: Brown GG, Fragoso C. [Eds.]. *Minhocas na América Latina: Biodiversidade e ecologia*. Londrina: EMBRAPA. pp. 287–296.
- Huang, J., Xu Q, Sun, Z.J., Tang G.L. y Su. Z. Y. 2007. Identifying earthworms through DNA barcodes. *Pedobiologia*. 51:301–309.
- Reynolds, J.W. 1996. *Earthworm Biology and Ecology*. Course manual for Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 196pp.
- Righi G. 1979. Introducción al estudio de las lombrices del suelo (oligoquetos megadrilos) de la Provincia de Santa Fe (Argentina). *Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral Colección Climax*, 2:89–155.
- Sims RW, Gerard BM. 1985. *Earthworms. Keys and notes for the identification and study of the species*. The Linnean Society of London and The Estuarine and Brackish water Sciences Association. The Pitman Press, Bath.