

Kan man minska användningen av fungicider med Inducerad resistens?

– Försök med BABA mot potatisbladmögel

Induced resistance - a way to reduce fungicide usage?

– Experiments with BABA against potato late blight

Oskar Hansson



Kan man minska användningen av fungicider med Inducerad resistens?

Induced resistance - a way to reduce fungicide usage?

Oskar Hansson

Handledare: Erland Liljeroth, SLU, Alnarp,
Område Växtskyddsbiologi

Btr handledare: Therese Bengtsson, SLU, Alnarp,
Område Växtskyddsbiologi

Examinator: Erik Andreasson, SLU, Alnarp,
Område Växtskyddsbiologi

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grund C

Serietitel: Självständigt arbete vid LTJ-fakulteten, SLU

Kurstitel: Examensarbete inom Hortonomprogrammet

Kurskod: EX0369

Program/utbildning: Hortonomprogrammet

Utgivningsort: Alnarp

Utgivningsår: 2010

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: inducerad resistens, potatisbladmögel, fungicid, BABA



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för landskapsplanering, trädgårds- och jordbruksvetenskap
Område Växtskyddsbiologi

Sammanfattning

Potatisbladmögel som orsakas av oomyceten *Phytophthora infestans* rankas som den mest destruktiva skadegöraren inom jordbruket världen över. Den mest effektiva metoden för att bekämpa potatisbladmögel idag är en frekvent användning av fungicider. Det kan dels vara skadligt för miljön och människors hälsa men även innebära stora ekonomiska kostnader.

Aktivering av växtens egna försvar, så kallad inducerad resistens, kan vara ett miljövänligare och mer hållbart alternativ att bekämpa potatisbladmögel med. β -aminobutansyra (BABA), en aminosyra, inducerar växtens försvar och har visat sig effektiv i många växtslag däribland i potatis mot *P. infestans*.

I det här försöket har BABAs effekt i kombination med två olika fungicider, Ranman och Revus testats. Potatissorterna som användes var Bintje (mottaglig) och Ovatio (partiell resistent). Plantorna behandlades med fungiciden och BABA, var för sig samt i olika kombinationer. Bladen infekterades därefter med *P. infestans* och diametern på lesionen mättes.

Resultatet visar att det är möjligt att minska dosen fungicid och ändå få en fullgod effekt i både Bintje och Ovatio. 5 % av full dos Ranman i kombination med 95 % av full dos BABA visade sig vara lika effektiv som när enbart full dos Ranman applicerades.

Steget till att använda BABA i odling är dock långt. Fler försök krävs både i växthus och i fält. BABAs effekt i fält kan vara mindre då växtens försvar till en viss grad redan kan vara inducerat.

För att se vilka proteiner, kopplade till växtens försvar, som sekreteras i potatisblad efter behandling med BABA utfördes en analys av sekretomet. Analysen gjordes på plantor av sorterna Bintje och Ovatio. Plantorna behandlades med BABA och blad från dessa samt från en obehandlad kontrollplanta analyserades. Resultatet visar att förvarsproteinerna PR-1 och 1,3- β -glukanas bildas i högre grad i en BABA-behandlad planta jämfört med i den obehandlade kontrollen. Detta visar att en del av BABAs inducering av potatisens försvar sker genom en direkt aktivering och inte enbart genom priming.

Abstract

Potato late blight caused by the oomycete *Phytophthora infestans* ranks as the most destructive plant disease worldwide. Today the only efficient management method to control late blight is by frequent use of fungicides, which may have a negative impact on the environment and costs enormous amounts of money for the potato industry. Activation of the plants own defenses, so called induced resistance can be an important tool for helping to control late blight.

β -aminobutyric acid (BABA), a non-protein amino acid, induces resistance in many different plants and has been proven to have an effect in potato against *P. infestans*.

To investigate to what degree the applied dose of fungicide can be reduced if it is combined with BABA, greenhouse experiments were carried out. Two different potato cultivars, Bintje and Ovatio were used and they were treated with the fungicides Ranman or Revus in different combinations with BABA. The leaves were inoculated with *P. infestans* and the lesion diameter was measured.

The result shows that the fungicide dose can be reduced in both cultivars. Although Ranman alone was highly effective, the combination effect with BABA became clear at the lowest reduced dose. The combination of 5 % of full dose Ranman combined with 95 % of full dose BABA was as good as full dose Ranman alone.

The experiment with Revus failed due to unsuccessful infection with *P. infestans*.

A secretome analysis was made to find out if there were any proteins related to the plant defense secreted in potato leaves treated with BABA. Plants of both Bintje and Ovatio were treated with BABA and the secretome was analyzed together with an untreated control plant. The results showed that PR1-protein and 1,3- β -glucanase, involved in plant defense, was produced to a higher extent in BABA-treated plants. Thus, it shows that the defense is activated early after BABA treatment, even before further challenge with the pathogen.

Förord

Författaren vill rikta ett stort tack till sina handledare Therese Bengtsson och Erland Liljeroth för stöd och hjälp under arbetets gång samt till Ashfaq Ali och andra hjälpsamma människor på område Växtskyddsbiologi i Alnarp.

Lomma, 14 augusti 2010

Oskar Hansson

Innehållsförteckning

1. Introduktion	1
1.1 Bakgrund	1
1.2 Phytophthora infestans	1
1.3 Växtens försvar	2
1.4 Inducerad resistens	3
1.5 β -aminobutansyra (BABA)	3
1.6 PR-protein	5
1.7 Syfte	5
2. Material och metoder	6
2.1 Kombinationsförsök	6
2.1.1 Växtmaterial	6
2.1.2 Behandling	6
2.1.3 Inokulering	8
2.1.4 Statistiska analyser	8
2.2 Sekretomanalys	9
2.2.1 Isolering av sekretom	9
2.2.2 Separering och analys	9
3. Resultat	10
3.1 Kombinationsförsök	10
3.2 Sekretomanalys	12
4. Diskussion	13
5. Referenslista	16
6. Bilaga 1	19
7. Bilaga 2	20

1. Introduktion

1.1 Bakgrund

Potatisbladmögel, orsakat av oomyceten *Phytophthora infestans*, rankas som den mest destruktiva skadegöraren inom jordbruket världen över (Garelik G, 2002). Under 1840-talet dök den upp för första gången i Europa och orsakade bl.a. den stora katastrofen på Irland då miljoner människor svält ihjäl eller tvingades emigrera. Knappt 200 år senare orsakar den fortfarande stora problem världen över.

En frekvent användning av fungicider är idag den vanligaste metoden för bekämpning av potatisbladmögel (Olivieri 2007), vilket kan ha en negativ inverkan på miljön och dessutom innebära stora ekonomiska förluster för jordbruksindustrin. Varje år beräknas kostnaderna för fungicider och skördeförluster till ett par miljarder dollar (Duncan, 1999). Enligt Olivieri (2007) är förädling och inducerad resistens viktiga verktyg då det gäller att bekämpa *P. infestans* med minimal miljöpåverkan.

1.2 *Phytophthora infestans*

Phytophthora infestans och andra oomyceter betraktades ända till slutet av 1900-talet som svampar vilket visade sig vara felaktigt (Fry 2008). Forskning i molekylär genetik visade att det var en stor evolutionär skillnad mellan oomyceter och svampar varvid oomyceterna klassificerades till en egen grupp, mer besläktade med alger. *P. infestans* är en hemibiotrof patogen, vilket innebär att den först lever som biotrof på värdväxten under början av infektionsförloppet utan att orsaka visuella symptom (Kelley 2010). Därefter övergår den till att leva på död vävnad som nekrotrof parasit. Potatis, men även tomat och andra växter inom familjen Solanaceae tillhör värdväxterna (Agrios 2004).

Dess asexuella livscykel gör att den snabbt kan föröka sig. Sporangier med zoosporer produceras på sporangioforer som växer ut från den infekterade vävnaden (Fry 2008). Sporangierna kan spridas genom luften till andra plantor och kan gro direkt i fritt vatten och högre temperatur (optimum ca 20-25 °C). Sporangier kan frigöra zoosporer vid lite lägre temperaturer (optimum mellan 10 och 15 °C) som i sin tur kan angripa växten. Från sporangier och zoosporer växer det ut groddslangor som tränger in i växtvävnaden. Efter ca 2 dagar syns de första symptomen genom små nekrotiska fläckar och efter ytterligare några

dagar produceras nya sporangioforer med sporangier. Antal sporangier som produceras kan vara 300 000 per lesion och en sporangie innehåller oftast mellan 3 till 8 zoosporer (Agrios). *P. infestans* kan infektera alla delar av växten.

Den sexuella förökningen kräver två olika parningstyper, A1 och A2. Under lång tid fanns bara den ena parningstypen A1 representerad i större delen av världen, vilket bidrog till att endast asexuell förökning var möjlig. Under 1980-talet spred sig den andra parningstypen, A2, över världen från sitt ursprung i Mexiko. Möjligheten att föröka sig sexuellt har lett till en ökad variation och anpassningsförmåga hos patogenen samt ett nytt överlevnadssätt utan värdväxten (Fry 2008, Andersson et al. 2009). En oospor kan överleva i jorden under mer än 4 år. Andersson et al. (2009) menar att produktionen av oosporer kan vara anledningen till att bladmögelangrepp kommer allt tidigare på säsongen.

1.3 Växtens försvar

Växter kan försvara sig mot en patogen på många olika sätt. Den har både ett passivt, konstant försvar och ett aktivt, inducerat försvar.

Ett fungerande aktivt försvar är ofta förknippat med hypersensitivitetsreaktionen (HR). HR leder till lokal celledöd kring det infekterade området och hindrar därmed patogenen att sprida sig vidare. Aktiveringen av den tidiga responsen mot en patogen triggas genom en interaktion mellan produkterna från en resistensgen (R-gen) hos värdväxten och patogenens avirulensgen (Gozzo 2003). Det första som händer är en snabb produktion av fria syreradikaler som t.ex. väteperoxid, H₂O₂. Förloppet kallas för en ”oxidative burst” och leder indirekt till celledöd i och kring den infekterade vävnaden. Andra effekter som triggas av de fria syreradikalerna är förstärkning av cellväggarna kring infektionsstället samt bildning av phytoalexiner, som har en direkt antimikrobiell verkan.

Efter en primär infektion kan växten få en ökad motståndskraft mot kommande patogenangrepp, s.k. inducerad resistens (Walters and Heil 2007).

1.4 Inducerad resistens

Inducerad resistens som utvecklas lokalt och/eller systemiskt som reaktion mot ett patogenangrepp kallas för SAR (systemic acquired resistance) (Walters and Heil 2007). SAR ger växten en ökad generell resistens mot ett brett spektrum av virulenta patogener. Många författare är eniga om att växthormonet salicylsyra, vars produktion stimuleras av H₂O₂ från ”oxidative burst”, har en viktig roll som signalsubstans i den här typen av försvar (Gozzo 2003). Enligt Mur et al. (1996) har salicylsyran två roller. Den inducerar produktionen av PR-proteiner (patogenesrelaterade proteiner) som är inblandade i försvaret, och den ökar uttrycket för andra lokala försvarsgener, vilka inte reagerar direkt av salicylsyran utan induceras först vid ett kommande angrepp. Det senare kallas för ”priming” och ökar bl.a. produktionen av kallos vid patogenangrepp eller stress (Conrath et al. 2001).

En annan typ av inducerad resistens är ISR (induced systemic resistance) som aktiveras av vissa typer av icke-patogena och tillväxtstimulerande rotkoloniserande bakterier. ISR använder jasmonsyra och etylen som signalsubstanser och är generellt mer verksam mot nekrotrofa patogener, medan SAR verkar mot biotrofa patogener (Glazebrook, 2005).

1.5 β -aminobutansyra (BABA)

Att en växt som utsätts för en infektion från en patogen utvecklar en ökad resistens mot kommande patogenangrepp förstod man redan i början av 1900-talet (Conrath et al. 2001). Idag vet man att behandling med även andra ogiftiga ämnen (t.ex. icke-patogener, cellväggsfragment, plantextrakt och syntetiska ämnen) kan leda till en inducerad resistens hos växten (Walters et al. 2005). Ett av de mest effektiva ämnena är β -aminobutansyra (BABA) som är en icke-protein-aminosyra (Cohen et al. 1994), d.v.s. en aminosyra som inte används i proteinsyntesen. Många författare har visat att BABA inte har en toxisk effekt mot patogener in vitro (Cohen et al. 1994, Li et al. 1996, Hong et al. 1999), vilket indikerar att den aktiverar växtens egna försvar på något sätt. Det har även påvisats att BABA tas upp och transporteras till andra delar av växten med en ackumulering i de yngre bladen som är en stark sink (Jakab et al. 2001).

BABA har visat sig inducera resistens i en rad olika växtslag däribland ärtor, tobak, tomat, potatis och sallat. Exakt hur BABA inducerar resistens vet man inte (Eschen-Lippold et al. 2010) och effekterna verkar variera beroende på växtslag, patogen, koncentrationen BABA

och appliceringsmetod (Jakab et al. 2001, Gozzo 2003). Effekterna man har kunnat se är både en ansamling av kallos och lignin samt ackumulering av PR-proteiner, phytoalexiner och fenoler (Cohen et al 1994, Zimmerli et al. 2000, Altamiranda et al. 2008). BABA-inducerad resistens och priming har studerats hos *Arabidopsis* (Walters och Fountaine, 2009). Vilka mekanismer som är inblandade verkar bero på patogenen. Mot *Pseudomonas syringae* och *Botrytis cinerea* sker priming genom SA-inducerat försvar och mot t.ex. *Alternaria brassicicola* bildas mycket kallos.

Jakab et al. (2001) menar att det är svårt att avgöra BABAs sätt att verka eftersom den även kan ha en direkt toxisk effekt på bladet vilket kan vara direkt inducerande. Det bildas då små nekrotiska fläckar (HR) som en konsekvens av ”oxidative burst” vilket följs av en ackumulering av salicylsyra och uttryck av PR-protein (Cohen et al. 1994, Siegrist et al. 2000).

BABA har visat sig inducera resistens hos potatis mot *P. infestans*. Den har rapporterats ha effekt både genom minskad lesionsdiameter på bladen (Liljeroth et al 2010) och mindre angripna knölar efter infektion av *P. infestans* (Olivieri et al 2009). Olivieri et al (2009) visade en högre ansamling av phytoalexin och fenoler i BABA-behandlade plantor jämfört med en obehandlad kontroll. Dessutom hade dessa plantor fler antal knölar samt högre torrmasa. Både Olivieri et al. (2009) och Liljeroth et al. (2010) har påvisat betydelsen av potatissortens ursprungliga resistensnivå mot *P. infestans*. En mer resistent potatissort reagerar starkare på BABA än en mindre resistent. Vilka signalvägar som är inblandade i BABA-inducerad resistens i potatis mot *P. infestans* är oklart men enligt Eschen-Lippold et al (2010) har salicylsyra en viktig roll.

Försök har gjorts med att kombinera BABA med fungicider, då enbart applicering med BABA förmodligen inte kan ge fullt skydd mot *P. infestans*. Baider och Cohen (2003) har gjort ett försök med BABA i kombination med fungiciden mancozeb. Resultatet visade att kombinationen var signifikant mer effektiv än BABA och mancozeb var för sig. Både Cohen (2002) och Liljeroth et al. (2010) har visat att det är möjligt att minska dosen fungicid kraftigt och ändå kontrollera bladmöglet lika effektivt som med full dos fungicid.

Trots att BABA har visat sig inducera resistens i en mängd olika växthusförsök, så finns det få rapporter om fältförsök. Liljeroth et al. (2010) har i fältförsök visat att dosen av fungiciden Shirlan kunde minskas med 20-25% vid applicering i kombination med BABA och ändå ge samma effekt som applicering av full dos Shirlan för sig. De poängterar ändå att fler fältförsök behövs för att bekräfta att en reducerad dos kan användas i praktiken.

1.6 PR-protein

Van Loon och Van Strien (1999) definierar PR-proteiner som; Proteiner som kodas av värdväxten men induceras speciellt vid sjukdom eller relaterade situationer. Proteinerna delas in i 14 grupper efter deras aminosyrastruktur och egenskaper. Många av dem är enzymer t.ex. β -1,3-glukanas. PR-1-proteiner räknas som en viktig grupp och har använts som en biokemisk markör för SAR (Gozzo, 2003). Egenskapen hos PR-1-proteiner är inte helt klarlagd. Niderman et al. (1995) har visat att vissa PR-1-proteiner har effekt mot *P. infestans* genom att förhindra zoosporgroning in vitro och minska den infekterade bladytan hos tomat in vivo.

1.7 Syfte

Huvudsyftet var att undersöka BABAs effekt i kombination med två inte tidigare testade fungicider, Ranman och Revus. Hypotesen var att en reducerad dos fungicid som kombineras med BABA ska ge lika bra effekt som full dos fungicid ensam. En viktig fråga som ställdes var hur mycket som dosen av respektive fungicid kan sänkas.

Vilka proteiner som utsöndras från cellerna analyserades i ett sidoprojekt. Genom en analys av sekretomet, ville jag jämföra vilka proteiner som uttrycks efter behandling med BABA jämfört med en obehandlad kontroll. Frågan som ställdes var om BABA aktiverar syntesen av några försvarsproteiner direkt efter behandling.

2. Material och metoder

2.1 Kombinationsförsök

2.1.1 Växtmaterial

Certifierat utsäde av sorterna Bintje (mottaglig) och Ovatio (partiell resistent) användes i försöket. Utsädet kom från Agrico Nordic AB och var kvalitetssäkrat enligt jordbruksverkets bestämmelser. Knölna planterades i 2 liters plastkrukor med kommersiell planteringsjord (Weibull Horto). Jorden var torvbaserad med tillsats av 3 kg m^{-3} dolomitkalk, 3 kg m^{-3} kalksten, $0,7 \text{ kg m}^{-3}$ PG-mix gödning (NPK + mikronäringsämnen) och 120 kg m^{-3} sand (1-3 mm). Plantorna fick sedan stå i växthus med en dagslängd på 16 timmar. Temperaturen var ungefär $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ på dagen och $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ på natten. För att undvika bristsymptom gavs flytande näringslösning vid ett tillfälle.

Plantorna märktes efter den behandling de skulle få och placerades sedan slumpvis ut på växthusbordet.

2.1.2 Behandling

Då den första plantan började bilda blomknopp, behandlades plantorna med BABA och fungiciderna Ranman (Nordisk Alkali AB, Sverige. Verksam besatningsdel: Cyazofamid) eller Revus (Syngenta Crop Protection A/S, Danmark. Verksam beståndsdel: Mandipropamid), var för sig eller i kombination. Utifrån tillverkarens rekommendationer för full dos under fältförhållanden ($0,2 \text{ l ha}^{-1}$ för Ranman och $0,6 \text{ l ha}^{-1}$ för Revus) med en sprayvolym på 400 l ha^{-1} beräknades motsvarande koncentrationer för växthusförsöken ($0,05 \text{ } \%$ (v/v) för Ranman och $0,15 \text{ } \%$ (v/v) för Revus). Full dos BABA sattes till 1 g l^{-1} ($0,4 \text{ kg ha}^{-1}$).

Plantorna, av sorterna Bintje och Ovatio, behandlades med 0,5, 20, 50 och 100 % av full dos BABA ensam och 0, 5, 20, 50 och 100 % av full dos Ranman/Revus ensam. Kombinationerna av BABA och fungicid applicerades enligt följande: 95 + 5 %, 80 + 20 %, 50 + 50 %, 20 + 80 % och 5 + 95 % av fulldos BABA respektive Ranman/Revus (se tabell 1 och 2).

Tabell 1. Försöksplan med fungiciden Ranman.

Led nr.	% av Rek. Dos		% (v/v)		akt. Lsn.
	Ranman	BABA	Ranman	BABA	
1	0	0			
2	100		0,05		0,0375
3	50		0,025		0,01875
4	20		0,01		0,0075
5	5		0,0025		0,001875
6		100		0,1	
7		50		0,05	
8		20		0,02	
9		5		0,005	
10	95	5	0,0475	0,005	0,035625
11	80	20	0,04	0,02	0,03
12	50	50	0,025	0,05	0,01875
13	20	80	0,01	0,08	0,0075
14	5	95	0,0025	0,095	0,001875

Tabell 2. Försöksplan med fungiciden Revus

Led nr.	% av Rek. Dos		% (v/v)	
	Revus	BABA	Revus	BABA
1	0	0		
2	100		0,15	
3	50		0,075	
4	20		0,03	
5	5		0,0075	
6		100		0,1
7		50		0,05
8		20		0,02
9		5		0,005
10	95	5	0,1425	0,005
11	80	20	0,12	0,02
12	50	50	0,075	0,05
13	20	80	0,03	0,08
14	5	95	0,0075	0,095

Plantorna sprayades tills alla blad var täckta och vätskan började rinna av. Den obehandlade kontrollen sprayades med motsvarande mängd destillerat vatten.

Tre plantor användes för varje behandling och sort. Tre dagar efter behandling plockades tre blad från varje planta för inokulering med *P. infestans*. Det gav 9 replikat per behandling och sort.

2.1.3 Inokulering

Bladen plockades från de översta, fullt utvecklade sammansatta bladen närmast toppbladet. De placerades sedan upp och ner på ett nät i en plastlåda med fuktat filterpapper i 15 °C under 2 h innan inokulering.

P. infestans SE03058, parningstyp A1, erhållen från Dr. Björn Andersson på Institutionen för skoglig mykologi och patologi, SLU, användes i försöket. Dessa odlades på agarplattor med råg- eller ärtmedium. *P. infestans* slammades upp i sterilt vatten och filtrerades sedan så att endast sporangierna följde med. Antalet sporangier räknades och späddes sedan till koncentrationen 36 000 sporangier ml⁻¹. Suspensionen med sporangierna inkuberades sedan under 2-3 h i 15 °C mörker för att frigöra zoosporerna.

Varje blad inokulerades med en droppe (20 µl) av sporsuspensionen vid mittnerven på den största halvan av bladet. De inokulerade bladen placerades sedan i en inkubator under 1 dygn i 15 °C och mörker, därefter under 3 dygn vid 20 °C dagtid och 15 °C nattetid med 16 h dagslängd. Resten av tiden stod de i samma dagslängd fast med 15 °C dygnet runt. Efter totalt 7 dygn mättes diametern av lesionerna. På varje blad uppskattades också graden av sporulering enligt tre nivåer; Ingen sporulering, lätt till måttlig sporulering och intensiv sporulering

Inokuleringen och infektionsbedömningen skedde enligt Eucablights protokoll (www.eucablight.org).

2.1.4 Statistiska analyser

För att analysera effekterna av de olika behandlingarna användes variansanalys (GLM), och statistiskt signifikanta skillnader mellan enskilda behandlingar undersöktes med Tukey's "multiple range" test eller t-test. (se rådata i bilaga 2)

2.2 Sekretomanalys

I försöket användes sorterna Bintje och Ovatio och de odlades på samma sätt som i det föregående försöket. Bladen behandlades med BABA av koncentrationen 1 g L^{-1} . Efter två dagar plockades blad från behandlade och obehandlade plantor för analys.

Försöket kan beskrivas i två steg. Isolering av sekretomet (som är de proteiner som avsöndras från cellen) och separering av proteinerna med gelelektrofores.

2.2.1 Isolering av sekretom

Isoleringen av sekretomet skedde enligt ett protokoll utvecklat av Ashfaq Ali, SLU Alnarp (opublicerat).

Bladen doppades i 1 % tween 20 under 15-20 sek, för att minska ytspänningen och underlätta infiltreringen av bladen. Bladen torkades på papper och placerades i en petriskål med fosfatbuffert i 5 + 5 min. Sedan torkades bladen försiktigt på papper än en gång. Fyra blad per prov placerades i 15 ml Falconrör innehållande 3 μl av en inhibitorlösning bestående av proteas- och fosfatasinhibitorer (se bilaga 1) och en metallring för att separera bladen från supernatanten. Rören centrifugerades med 3000 rpm i 3 minuter och vid $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Supernatanten pipetterades sedan upp i eppendorfrör, 3 x 30 μl och frystes in i väntan på gelseparering.

2.2.2 Separering och analys

Separeringen gjordes med en 14 % SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) som separerar proteinerna efter storlek. Innan proverna laddades på gelen denaturerades proteinerna. Denatureringen skedde genom tillsats av 6 μl av 6x SDS innehållande DTT. Proven inkuberades vid $65 \text{ }^\circ\text{C}$ i 10 minuter. Gelen laddades med proverna och en SM0661-markör (Fermentas, St. Leon-Rot, Tyskland) med kända molekylvikter. Gelen kördes i 80 volt under de första 20 minuterna och därefter i 120 volt. Efter dryga 45 minuter avbröts gelelektroforeringen. Efter elektroforeringen färgades gelen in med Coomassie Brilliant Blue (CBB) för att visualisera de separerade proteinerna. Band med storleken 15 kDa och 33 kDa identifierades som PR-1 respektive 1,3- β -glukanas baserat på tidigare verifiering av Ashfaq Ali, SLU Alnarp. Tre biologiska replikat kördes.

3. Resultat

3.1 Kombinationsförsök

Ranman visade sig vara effektiv och förhindrade infektionen helt i många behandlingar. I figur 1 ser vi att i många behandlingar ligger medelvärdet på lesionsdiametern kring 5 mm. Detta är den ungefärliga storleken på droppen med zoosporsuspensionen och visar på att infektionsprocessen avstannade direkt.

Variansanalys (GLM) gjordes för att se om det fanns några signifikanta skillnader mellan behandlingarna inom varje behandlingstyp; Ranman, BABA samt i kombinationerna av dessa två.

Behandlingar med endast Ranman visade ingen signifikant skillnad mellan 100, 50 och 20 % av full dos i varken Bintje eller Ovatio. 5 % av full dos hade däremot sämre effekt och skiljde sig från övriga doser, varav det var signifikant i Bintje ($p < 0,02$).

Behandlingar med endast BABA visade inga signifikanta skillnader.

Behandlingar med kombinationen Ranman + BABA visade inga signifikanta skillnader, dvs. alla doser var lika effektiva.

Eftersom behandlingen 5 % Ranman skiljde sig från behandlingar med högre koncentration Ranman gjordes ett t-test mellan den och kombinationen 5 % Ranman + 95 % BABA. Kombinationen visade sig vara signifikant effektivare, både i Bintje och i Ovatio ($p = 0,003$ resp. $p = 0,021$).

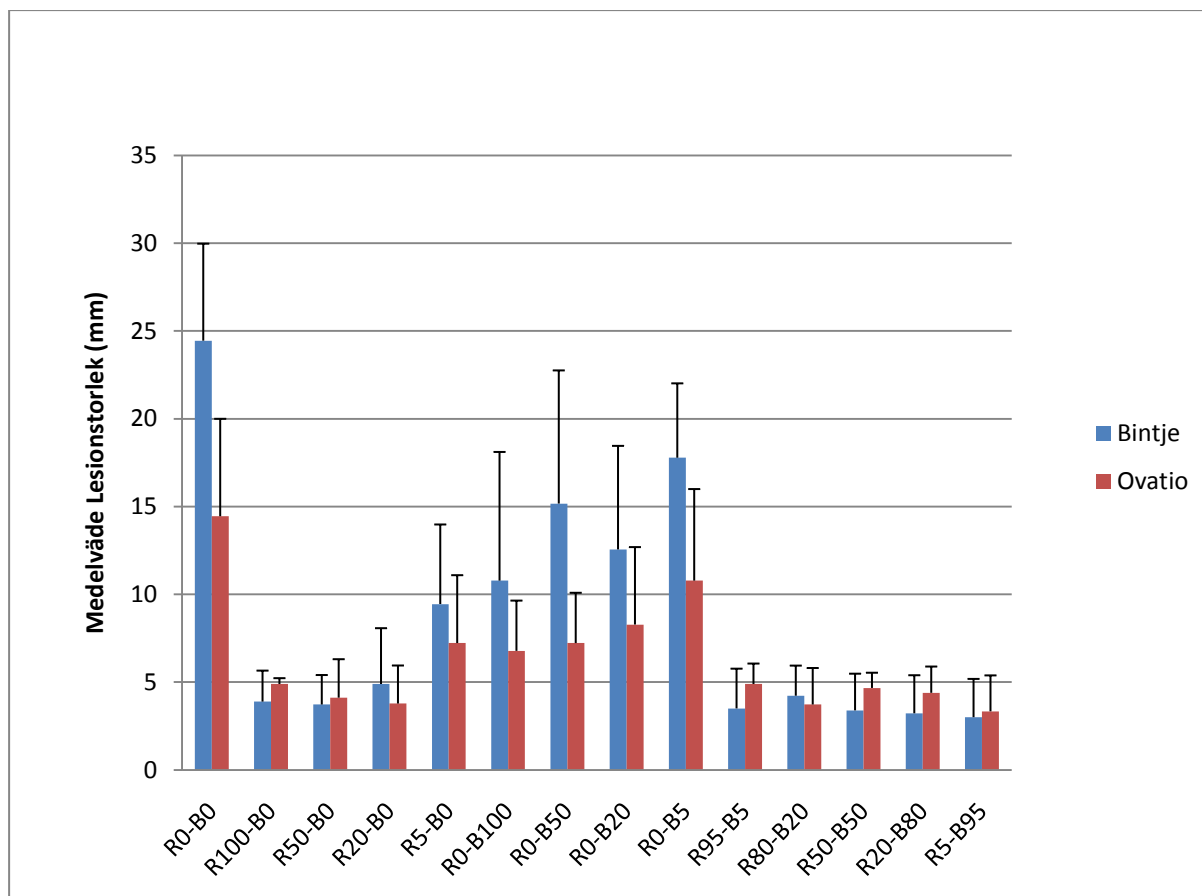


Fig. 1 Effekterna av BABA och fungiciden Ranman, var och en för sig samt i olika kombinationer efter infektion av *P. infestans*. Lesionsdiametern på bladen mättes. Behandlingarnas koncentrationer är angivna som procent av full dos, t.ex. R50-B50 betyder 50 % av full dos Ranman och 50 % av full dos BABA. Standardavvikelsen är åskådliggjord för varje behandling.

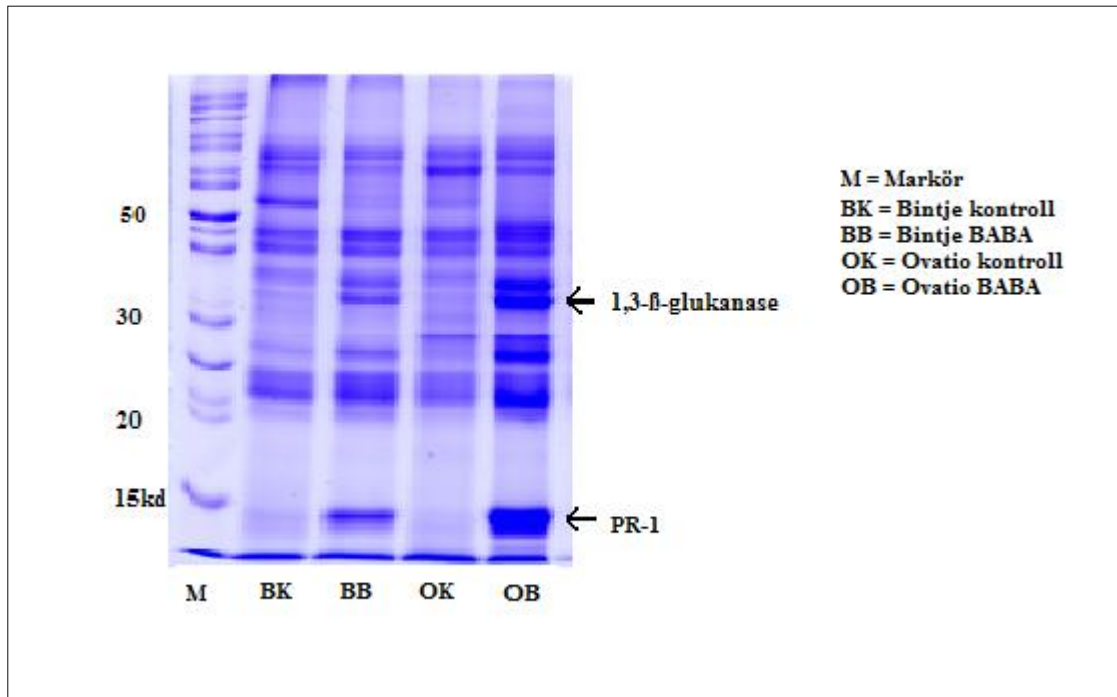
De blad som utsatts för en BABA-behandling visade vid avläsning små nekrotiska fläckar jämt fördelade över bladytan. Tendensen var att ju högre koncentration BABA desto fler fläckar. Detta gällde på både Bintje och Ovatio. Ovatio hade däremot dessa fläckar redan innan infektion, till skillnad från Bintje där fläckarna dök upp först efter infektion.

De blad som var infekterade av *P. infestans* visade en lätt till måttlig sporuleringsgrad.

Endast försöksomgången med fungiciden Ranman gav ett resultat. Försöket med fungiciden Revus som gjordes två veckor senare gav ingen infektion på någon behandling och därmed inga värden att räkna på.

3.2 Sekretomanalys

Banden på gelen visade att två olika slags proteiner som är kopplade till växtens försvar, PR1 samt 1,3- β -glukanas, hade sekreterats från BABA-behandlade plantor (figur 2).



Figur 2. Sekretomanalys av potatisblad. De erhållna banden visar proteiner separerade med SDS-PAGE. Band av PR-1 samt 1,3- β -glukanas var tydliga på de BABA-behandlade proverna. Ovatio hade tydligast band.

Bandet med storleken 15 kDa, vilken hade identifierats som PR1-protein, var tydligare i Ovatio jämfört med Bintje. Även bandet av storleken 32 kDa, identifierat som 1,3- β -glukanas var tydligare i Ovatio jämfört med Bintje.

4. Diskussion

Resultatet visar att det är möjligt att minska dosen fungicid och ändå få en fullgod effekt.

Ranman vid endast 20 % av rekommenderad dos hade lika bra effekt som full dos. Först vid 5 % avtog effekten mot potatisbladmöglet. Eftersom Ranman var effektiv så var det enbart vid den låga koncentrationen (5 % av full dos Ranman) som kombinationseffekten med BABA kunde ses. Slutsatsen av växthusförsöken är att dosen Ranman skulle kunna reduceras till 5 % av full dos och ändå ha fullgod effekt om den kombineras med 95 % av full dos BABA.

Ingen signifikant skillnad kunde ses mellan de olika behandlingarna med enbart BABA, d.v.s. 5 % av enbart BABA var lika effektiv som 95 % av enbart BABA.

Det är svårt att säga om effekten av kombinationen BABA och Ranman skulle bli detsamma i fältförsök som i växthusförsök eftersom inducering av växtens försvar kan vara annorlunda under fältomständigheter. En potatisplanta som växer på friland är betydligt mer utsatt av olika typer av stress som i sig skulle kunna inducera försvarsreaktioner. Därför kan man tänka sig att BABA-inducerad resistens inte har lika stor påverkan på resultatet i fält. Endast ett fåtal fältförsök har gjorts och rapporterats i litteraturen. Ett försök där fungiciden Shirlan kombinerades med BABA visade dock att dosen Shirlan kunde reduceras med 20-25 % i både växthus- och fältförsök (Liljeroth et al. 2010). Liljeroth et al. poängterar att fler fältförsök behövs för att få klarhet i om och hur en reducerad dos skulle kunna användas i praktiken.

Att minska fungicidanvändningen är av stort intresse. Dels av miljömässiga skäl, men också för att problemen med fungicidresistens är stora. *P. infestans* stora anpassningsförmåga och höga evolutionstakt gör att den snabbt utvecklar resistens mot fungicider. Att reducera dosen fungicid genom kombination med inducerad resistens skulle kunna göra fungiciden effektivare och dess användningstid längre och samtidigt ge minskade kostnader för fungiciderna.

Sekretomanalysen visade att PR-1 protein och 1,3- β -glukanas bildades efter BABA-behandling, vilket kan tyda på att SAR är aktiverat redan innan patogenangrepp. Vilken betydelse har då detta?

Om försvaret är aktiverat redan innan patogenen angriper, till skillnad från "priming" där försvaret aktiveras snabbare och effektivare först vid patogenangrepp, skulle det kunna betyda

en kostnad för växten. Om växten lägger en större del av sin energi på försvaret kommer detta ha en negativ inverkan på tillväxten. För att ta reda på mera om detta har det gjorts försök på olika mutanter av modellväxten *Arabidopsis* (van Hulten et al 2006). En av mutanterna var okänslig för BABA, en hade konstitutiv priming, och en konstitutiv aktiverat försvar. Försöken visade att vid högre koncentration BABA aktiverades försvaret direkt medan en lägre koncentration ledde till priming. Även om direkt aktiverat försvar gav en bättre resistens så blev kostnaderna genom minskad tillväxt lika höga som de sjukdomsrelaterade kostnaderna hos en icke-inducerad växt. Priming ledde bara till en marginell minskning i tillväxt och fördelarna med priming var större än kostnaderna under sjukdomsförhållanden.

Resistensförädlingen i potatis mot *P. infestans* har genom åren handlat mycket om R-gener, dvs. om en eller ett få antal gener som ger fullständig resistens. Detta har aldrig fungerat under särskilt lång tid eftersom nya raser av patogenen ständigt dyker upp. Inducerad resistens är bra på så vis att många gener är inblandade vilket gör att patogenen inte kan anpassa sig lika lätt. Inducerad resistens har visat sig aktivera växtens försvar olika mycket beroende på sorten och dess basala resistens. Ovatio har i försök reagerat bättre på BABA än vad Bintje har. I mitt försök fanns inga signifikanta skillnader mellan de två sorterna utan båda reagerade likvärdigt. Däremot visade sekretomanalysen en större bildning av försvarsproteiner i Ovatio jämfört med Bintje.

Mer kunskap om hur mekanismerna bakom BABA-inducerad resistens fungerar och framförallt hur priming fungerar kan ge möjligheter att förädla fram sorter som reagerar bättre på inducerad resistens. Idag finns det en teori om att priming och ökad känslighet beror på en bildning av ett icke-aktivt signalprotein (Beckers et al 2009).

Aktiveringen av PR1-proteiner och 1,3- β -glukanas som sekretomanalysen visade och det faktum att blad som behandlats med högre koncentrationer BABA visar små nekrotiska fläckar över hela bladet, pekar på en direkt inducerande effekt av BABA (se introduktionen). BABA orsakar små hypersensitivitetsreaktioner, som aktiverar försvaret direkt. Att så höga doser av BABA krävs för att ge effekt har dock visats i flera försök (Liljeroth et al. 2010). Även om försvaret aktiveras direkt har inga skördeminskningar till följd av BABA-behandlingar hittills rapporterats i potatis. (Olivieri et al. 2009, Liljeroth et al. 2010).

Anledningen till att försöket med Revus misslyckades kan bero på inkuberingen efter inockuleringen. Direkt efter inockulering placerades bladen i 15 °C mörker för att zoosporerna skulle gro. Försöket med Ranman stod i 24 h medan försöket med Revus stod i

endast 12 h innan inkuberingen övergick till 20 °C dagtid och 15 °C nattetid. Möjligtvis behövdes en längre period av lägre temperatur i början för att zoosporerna skulle gro. Det kan vara en anledning till att infektionen i försöket med Revus inte tog.

Fortsatta studier och försök krävs för att se hur BABA-inducerad resistens fungerar under fältomständigheter. Fler försök är också nödvändiga för att se olika fungiciders effekt i kombination med BABA. Försöket med Ranman skulle kunna upprepas med lägre koncentrationer av fungiciden för att tydligare kunna se kombinationseffekten med BABA. Ranman var väldigt effektiv, vilket kan bero på att preparatet är relativt nytt på marknaden och patogenen inte har anpassats sig än samt att doserna i försöket utgick från tillverkarens rekommendationer vid fältförhållanden och inte för växthusförsök.

Försöken visade att det inte fanns någon signifikant skillnad mellan behandlingarna med enbart BABA, vilket är anmärkningsvärt då andras resultat visar tydliga skillnader mellan olika doser. Liljeroth et al (2010) visade på en tydlig doseffekt med BABA.

Fortsatta försök för att bestämma hur låg dos av BABA man kan använda i kombination med fungicid skulle vara av intresse, då BABA är en kemikalie som idag framställs med höga produktionskostnader.

5. Referenslista

- Agrios, G.N. (2004) *Plant Pathology*. 5. ed. *ELSEVIER academic press*.
- Altamiranda, E.G., Andreu, A. B., Daleo, G. R., Olivieri, F. P. (2008) Effect of β -aminobutyric acid (BABA) on protection against *Phytophthora infestans* throughout the potato crop cycle. *Australasian Plant Pathology*, 37, 421-427
- Andersson, B., Widmark, A. K., Yuen, J. E., Nielsen, B., Ravnskov, S., Kessel, G. J. T., Evenhuis, A., Turkensteen, L. J., Hansen, J. G., Lehtinen, A., Hermansen, A., Brurberg, M. B., Nordskog, B. (2009) The role of oospores in the epidemiology of potato late blight. *Acta Horticulturae*. 61-68.
- Baider, A., Cohen, Y. (2003). Synergistic interaction between BABA and mancozeb in controlling *Phytophthora infestans* in potato and tomato and *Pseudoperonospora cubensis* in cucumber. *Phytoparasitica* . 31. 399-409
- Beckers, G. J. M., Jaskiewicz, M., Liu, Y. D., Underwood, W. R., He, S. Y., Zhang, S. Q., Conrath, U. (2009) Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 21. 944-953.
- Cohen, Y., Niderman, T., Mosinger, E., Fluhr, R. (1994) Beta-Aminobutyric Acid Induces The Accumulation Of Pathogenesis-Related Proteins In Tomato (*Lycopersicon-Esculentum L.*) Plants And Resistance To Late Blight Infection Caused By *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology*. 104. 59-66.
- Cohen, Y. R. (2002) β -aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. *Plant Disease*, 86, 448-457.
- Conrath, U., Thulke, O., Katz, V., Schwindling, S., Kohler, A. (2001). Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. *European Journal of Plant Pathology*. 107. 113-119.
- Duncan, J. (1999) *Phytophthora* - an abiding threat to our crops. *Microbiology today*, 26, 114-116
- Eschen-Lippold, L., Altmann, S., Rosahl, S. (2010) DL- β -Aminobutyric Acid – Induced Resistance of Potato Against *Phytophthora infestans* Requires Salicylic Acid but Not Oxylipins. *The American Phytopathological Society*, 23, 585-592
- Fry, W. (2008) *Phytophthora infestans*: the plant (and R-gene) destroyer. *Molecular plant pathology*. 9. 385-402
- Glazebrook, J. (2005) Contrasting Mechanisms of Defense against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Phytopathology*, 43. 205-227.
- Garelik, G. (2002) Agriculture- Taking the bite out of potato blight. *Science* 298 p. 1702-1704

- Goellner, K., Conrath, U. (2007) Priming: It's all the world to induced disease resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 233-242
- Gozzo, F. (2003) Systemic acquired resistance in crop protection: From nature to a chemical approach. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*. 51. 4487-4503.
- Hong, JK., Hwang, BK., Kim, CH.(1999) Induction of local and systemic resistance to *Colletotrichum coccodes* in pepper plants by DL-beta-amino-n-butyric acid. *Journal of Phytopathology*. 147. 193-198.
- Jakab, G., Cottier, V., Toquin, V., Rigoli, G., Zimmerli, L., Mettraux, JP., Mauch-Mani, B. (2001) beta-Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology* 107. 29-37.
- Kelley, BS., Lee, SJ., Damasceno, CMB., Chakravarthy, S., Kim, BD., Martin, GB., Rose, JKC. (2010) A secreted effector protein (SNE1) from *Phytophthora infestans* is a broadly acting suppressor of programmed cell death. *Plant Journal*, 62. 357-366
- Liljeroth, E; Bengtsson, T; Wiik, L; Andreasson, E. (2010) Induced resistance in potato to *Phytophthora infestans* - effects of BABA in greenhouse and field tests with different potato varieties. *European Journal of Plant Pathology*, 127, 171-183
- Mur, L.A.J., Naylor G., Warner SAJ., Sugars JM., White RF., Draper J. (1996) Salicylic acid potentiates defence gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. *Plant Journal*. 9. 559-571
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyere, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B., Mosinger, E. (1995) Pathogenesis-related pr-1 proteins are antifungal - isolation and characterization of 3 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic pr-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology* 108. 17-27.
- Olivieri, F. P., Lobato, M. C., Gonzalez Altamiranda, E., Daleo, G. R., Huarte, M., Guevara, M. G., Andreu, A. B. (2009) BABA effects on the behavior of potato cultivars infected by *Phytophthora infestans* and *Fusarium solani*. *European Journal of Plant Pathology*. 123, 47-56
- Walters, D. and Fountaine, J. M. (2009) Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under field conditions. *Journal of agricultural science*. 147, 523-535.
- Walters, D. and Heil, M. (2007) Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 71. 3-17
- Walters, D., Walsh, D., Newton, A. and Lyon, G. (2005) Induced Resistance for Plant Disease Control: Maximizing the Efficacy of Resistance Elicitors. *The American Phytopathological Society*. 95. 1368-1373

van Hulten, M., Pelser, M., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J., Ton, J. (2006) Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America*. 103, 5602-5607.

Van Loon, L.C. and Van Strien (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* . 55. 85-97

Zimmerli, L., Jakab, G., Métraux, J.-P., and Mauch-Mani, B. (2000) Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by β -aminobutyric acid. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 97, 12920-12925.

6. Bilaga 1

Proteas- och fosfatasinhibitorer beräknade för 200 µl sekretom (enligt Ashfaq Ali, SLU Alnarp)

NaMo, 2 µl 100mM (1 mM final)

NaF, 2 µl 500mM (5 mM final)

NaPP (Sodium PyroPhosphate), 50 mM final concentration.

Sodium ortho Vandate, some.

PMSF, 2 µl 100mM (1 mM final)

7. Bilaga 2

General Linear Model: Bintje. Behandling 2-5 (bara Ranman)

Factor	Type	Levels	Values
Behandling Bintje	fixed	4	2; 3; 4; 5

Analysis of Variance for Resultat, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Behandling Bintje	3	195,188	195,188	65,063	7,12	0,001
Error	32	292,556	292,556	9,142		
Total	35	487,743				

S = 3,02363 R-Sq = 40,02% R-Sq(adj) = 34,40%

Unusual Observations for Resultat

Obs	Resultat	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
27	12,0000	4,8889	1,0079	7,1111	2,49 R
34	17,0000	9,4444	1,0079	7,5556	2,65 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Tukey 95,0% Simultaneous Confidence Intervals

Response Variable Resultat

All Pairwise Comparisons among Levels of Behandling Bintje

Behandling Bintje = 2 subtracted from:

Behandling Bintje	Lower	Center	Upper
3	-4,027	-0,1667	3,694
4	-2,860	1,0000	4,860
5	1,695	5,5556	9,416

Behandling Bintje = 3 subtracted from:

Behandling Bintje	Lower	Center	Upper
4	-2,694	1,167	5,027
5	1,862	5,722	9,582

Behandling Bintje = 4 subtracted from:

Behandling Bintje	Lower	Center	Upper
5	0,6954	4,556	8,416

Tukey Simultaneous Tests

Response Variable Resultat

All Pairwise Comparisons among Levels of Behandling Bintje

Behandling Bintje = 2 subtracted from:

Obs	Resultat	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
17	0,5000	15,1667	2,1338	-14,6667	-2,43 R

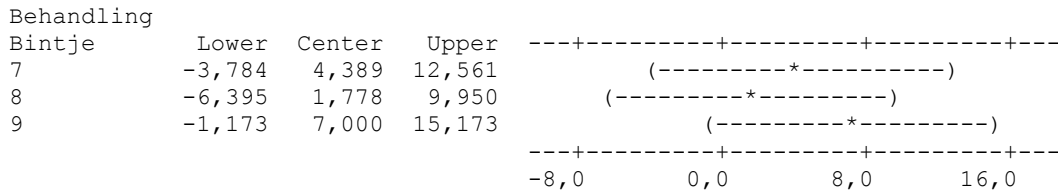
R denotes an observation with a large standardized residual.

Tukey 95,0% Simultaneous Confidence Intervals

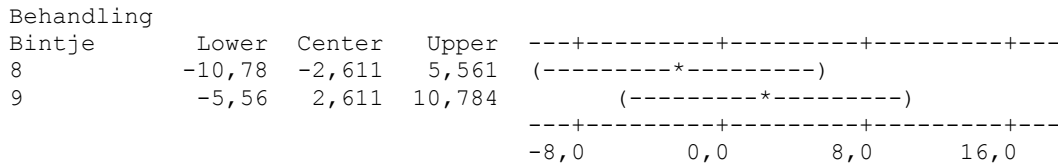
Response Variable Resultat

All Pairwise Comparisons among Levels of Behandling Bintje

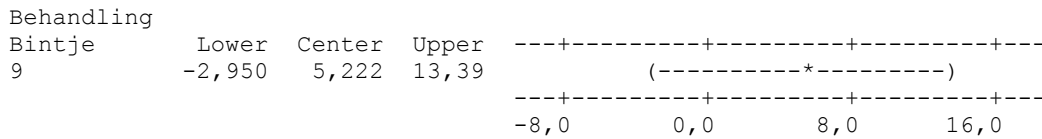
Behandling Bintje = 6 subtracted from:



Behandling Bintje = 7 subtracted from:



Behandling Bintje = 8 subtracted from:



Tukey Simultaneous Tests

Response Variable Resultat

All Pairwise Comparisons among Levels of Behandling Bintje

Behandling Bintje = 6 subtracted from:

Behandling Bintje	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
7	4,389	3,018	1,4544	0,4760
8	1,778	3,018	0,5891	0,9346
9	7,000	3,018	2,3197	0,1147

Behandling Bintje = 7 subtracted from:

Behandling Bintje	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
8	-2,611	3,018	-0,8653	0,8226
9	2,611	3,018	0,8653	0,8226

Behandling Bintje = 8 subtracted from:

Behandling Bintje	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
9	5,222	3,018	1,731	0,3251

General Linear Model: Ovatio. Behandling 6-9 (bara BABA)

Factor Type Levels Values
 Behandling Ovatio fixed 4 6; 7; 8; 9

Analysis of Variance for Resultat, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Behandling Ovatio	3	86,52	86,52	28,84	1,83	0,161
Error	32	504,22	504,22	15,76		
Total	35	590,74				

S = 3,96950 R-Sq = 14,65% R-Sq(adj) = 6,64%

Unusual Observations for Resultat

Obs	Resultat	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
19	0,5000	8,2778	1,3232	-7,7778	-2,08 R
34	1,0000	10,7778	1,3232	-9,7778	-2,61 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Tukey 95,0% Simultaneous Confidence Intervals

Response Variable Resultat

All Pairwise Comparisons among Levels of Behandling Ovatio

Behandling Ovatio = 6 subtracted from:

Behandling

Ovatio	Lower	Center	Upper	
7	-4,623	0,4444	5,512	(-----*-----)
8	-3,568	1,5000	6,568	(-----*-----)
9	-1,068	4,0000	9,068	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----
 -4,0 0,0 4,0 8,0

Behandling Ovatio = 7 subtracted from:

Behandling

Ovatio	Lower	Center	Upper	
8	-4,012	1,056	6,123	(-----*-----)
9	-1,512	3,556	8,623	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----
 -4,0 0,0 4,0 8,0

Behandling Ovatio = 8 subtracted from:

Behandling

Ovatio	Lower	Center	Upper	
9	-2,568	2,500	7,568	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----
 -4,0 0,0 4,0 8,0

Tukey Simultaneous Tests

Response Variable Resultat

All Pairwise Comparisons among Levels of Behandling Ovatio

Behandling Ovatio = 6 subtracted from:

Behandling Ovatio	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
-------------------	---------------------	------------------	---------	------------------

7	0,4444	1,871	0,2375	0,9952
8	1,5000	1,871	0,8016	0,8532
9	4,0000	1,871	2,1376	0,1631

Behandling Ovatio = 7 subtracted from:

Behandling Ovatio	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
8	1,056	1,871	0,5641	0,9420
9	3,556	1,871	1,9001	0,2482

Behandling Ovatio = 8 subtracted from:

Behandling Ovatio	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
9	2,500	1,871	1,336	0,5475

General Linear Model: Bintje. Behandling 10-14 (Ranman + BABA)

Factor	Type	Levels	Values
Behandling Bintje	fixed	5	10; 11; 12; 13; 14

Analysis of Variance for Resultat, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Behandling Bintje	4	7,700	7,700	1,925	0,44	0,779
Error	40	175,000	175,000	4,375		
Total	44	182,700				

S = 2,09165 R-Sq = 4,21% R-Sq(adj) = 0,00%

Unusual Observations for Resultat

Obs	Resultat	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
17	0,00000	4,22222	0,69722	-4,22222	-2,14 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Tukey 95,0% Simultaneous Confidence Intervals

Response Variable Resultat

All Pairwise Comparisons among Levels of Behandling Bintje

Behandling Bintje = 10 subtracted from:

Behandling Bintje	Lower	Center	Upper	
11	-2,095	0,7222	3,539	(-----*-----)
12	-2,928	-0,1111	2,706	(-----*-----)
13	-3,095	-0,2778	2,539	(-----*-----)
14	-3,317	-0,5000	2,317	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+
-2,5 0,0 2,5 5,0

Behandling Bintje = 11 subtracted from:

Behandling Bintje	Lower	Center	Upper	
12	-3,650	-0,833	1,983	(-----*-----)
13	-3,817	-1,000	1,817	(-----*-----)

14 -4,039 -1,222 1,595 (-----*-----)
 -----+-----+-----+-----+
 -2,5 0,0 2,5 5,0

Behandling Bintje = 12 subtracted from:

Behandling				
Bintje	Lower	Center	Upper	-----+-----+-----+-----+-----+
13	-2,983	-0,1667	2,650	(-----*-----)
14	-3,206	-0,3889	2,428	(-----*-----)
				-----+-----+-----+-----+-----+
				-2,5 0,0 2,5 5,0

Behandling Bintje = 13 subtracted from:

Behandling				
Bintje	Lower	Center	Upper	-----+-----+-----+-----+-----+
14	-3,039	-0,2222	2,595	(-----*-----)
				-----+-----+-----+-----+-----+
				-2,5 0,0 2,5 5,0

Tukey Simultaneous Tests

Response Variable Resultat

All Pairwise Comparisons among Levels of Handling Bintje

Behandling Bintje = 10 subtracted from:

Behandling	Difference	SE of		Adjusted
Bintje	of Means	Difference	T-Value	P-Value
11	0,7222	0,9860	0,7325	0,9476
12	-0,1111	0,9860	-0,1127	1,0000
13	-0,2778	0,9860	-0,2817	0,9986
14	-0,5000	0,9860	-0,5071	0,9862

Behandling Bintje = 11 subtracted from:

Behandling	Difference	SE of		Adjusted
Bintje	of Means	Difference	T-Value	P-Value
12	-0,833	0,9860	-0,845	0,9147
13	-1,000	0,9860	-1,014	0,8473
14	-1,222	0,9860	-1,240	0,7286

Behandling Bintje = 12 subtracted from:

Behandling	Difference	SE of		Adjusted
Bintje	of Means	Difference	T-Value	P-Value
13	-0,1667	0,9860	-0,1690	0,9998
14	-0,3889	0,9860	-0,3944	0,9947

Behandling Bintje = 13 subtracted from:

Behandling	Difference	SE of		Adjusted
Bintje	of Means	Difference	T-Value	P-Value
14	-0,2222	0,9860	-0,2254	0,9994

General Linear Model: Ovatio. Handling 10-14 (Ranman + BABA)

Factor	Type	Levels	Values
Behandling Ovatio	fixed	5	10; 11; 12; 13; 14

Analysis of Variance for Resultat, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Behandling Ovatio	4	15,367	15,367	3,842	1,49	0,222
Error	40	102,833	102,833	2,571		
Total	44	118,200				

S = 1,60338 R-Sq = 13,00% R-Sq(adj) = 4,30%

Unusual Observations for Resultat

Obs	Resultat	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
11	0,00000	3,72222	0,53446	-3,72222	-2,46 R
17	0,50000	3,72222	0,53446	-3,22222	-2,13 R
31	0,50000	4,38889	0,53446	-3,88889	-2,57 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Tukey 95,0% Simultaneous Confidence Intervals

Response Variable Resultat

All Pairwise Comparisons among Levels of Behandling Ovatio

Behandling Ovatio = 10 subtracted from:

Behandling

Ovatio	Lower	Center	Upper	
11	-3,326	-1,167	0,9926	(-----*-----)
12	-2,381	-0,222	1,9370	(-----*-----)
13	-2,659	-0,500	1,6592	(-----*-----)
14	-3,715	-1,556	0,6037	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----
-2,0 0,0 2,0

Behandling Ovatio = 11 subtracted from:

Behandling

Ovatio	Lower	Center	Upper	
12	-1,215	0,9444	3,104	(-----*-----)
13	-1,493	0,6667	2,826	(-----*-----)
14	-2,548	-0,3889	1,770	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----
-2,0 0,0 2,0

Behandling Ovatio = 12 subtracted from:

Behandling

Ovatio	Lower	Center	Upper	
13	-2,437	-0,278	1,8814	(-----*-----)
14	-3,493	-1,333	0,8259	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----
-2,0 0,0 2,0

Behandling Ovatio = 13 subtracted from:

Behandling

Ovatio	Lower	Center	Upper	
14	-3,215	-1,056	1,104	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----
-2,0 0,0 2,0

Tukey Simultaneous Tests

Response Variable Resultat

All Pairwise Comparisons among Levels of Behandling Ovatio
Behandling Ovatio = 10 subtracted from:

Behandling Ovatio	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
11	-1,167	0,7558	-1,544	0,5412
12	-0,222	0,7558	-0,294	0,9983
13	-0,500	0,7558	-0,662	0,9634
14	-1,556	0,7558	-2,058	0,2582

Behandling Ovatio = 11 subtracted from:

Behandling Ovatio	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
12	0,9444	0,7558	1,2495	0,7228
13	0,6667	0,7558	0,8820	0,9019
14	-0,3889	0,7558	-0,5145	0,9854

Behandling Ovatio = 12 subtracted from:

Behandling Ovatio	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
13	-0,278	0,7558	-0,368	0,9959
14	-1,333	0,7558	-1,764	0,4081

Behandling Ovatio = 13 subtracted from:

Behandling Ovatio	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
14	-1,056	0,7558	-1,397	0,6334

Two-Sample T-Test and CI: Bintje. Behandling 5 versus 14

Two-sample T for Resultat

Behandling	N	Mean	StDev	SE Mean
Bintje				
5	9	9,44	4,53	1,5
14	9	3,00	2,18	0,73

Difference = mu (5) - mu (14)

Estimate for difference: 6,44

95% CI for difference: (2,76; 10,13)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = 3,85 P-Value = 0,003 DF = 11

Two-Sample T-Test and CI: Ovatio. Behandling 5 versus 14

Two-sample T for Resultat

Behandling	N	Mean	StDev	SE Mean
Ovatio				
5	9	7,22	3,87	1,3
14	9	3,33	2,05	0,68

Difference = mu (5) - mu (14)

Estimate for difference: 3,89

95% CI for difference: (0,71; 7,07)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = 2,67 P-Value = 0,021 DF = 12