

Årsrapport avseende verksamhet 2015 och plan för 2016 för forskningsprojektet:

SKÖRDEÖKNING OCH ODLINGSSÄKERHET I PROTEINGRÖDAN ÅKERBÖNA (*VICIA FABA*) GENOM UTNYTTJANDET AV SYNERGISM MELLAN OLIKA RHIZOSFÄRBAKTERIER

Diarienummer: 2013-14

Björn Andersson (bjorn.le.andersson@slu.se)

Sadhna Alström (sadhna.alstrom@slu.se)

Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi
SLU, Uppsala

Bakgrund

Målet med projektet är att bidra med kunskap för att ta fram miljövänliga verktyg för en förbättrad odlingssäkerhet i åkerböna. I projektet studeras synergieffekter av utsädesbehandling med kombinationer av symbiotiska *Rhizobium*-bakterier och icke-symbiotiska tillväxtfrämjande rotbakterier (Plant Growth-Promoting Bacteria, PGPB).

Vår hypotes är att de positiva effekterna av ympning av utsäde av åkerböna med *Rhizobium* kan stärkas genom synergieffekter genom sam-ympning med PGPB. Detta samspel har potential att ge en förbättrad etablering, stimulera tillväxten och minska patogenangrepp i åkerböna och därmed öka skördens kvalitet och kvantitet.

Projektet är huvudsakligen finansierat av Ek hagastiftelsen.

Projektet innefattar:

- studier av stjälk- och rotangrepp, samt isolering av svamppatogener på åkerböna
- studier av i sjukdomsangrepp och rotknölbildning på olika sorter av åkerböna
- studier av effekten på planttillväxt, bildning av N-fixerande rotknölar samt sjukdomsangrepp hos åkerböna av utsädesympning med *Rhizobium*-stammar enskilt respektive vid sam-inokulering med tillväxtfrämjande bakterier

Verksamhet år 2015

Undersökningar av prover från 2014 års fältförsök

Gradering av rotprover

I fältförsöken 2014 ingick två åkerbönssorter, Taifun och Tattoo, som betades i olika behandlingar med *Serratia proteamaculans* S4, *Pseudomonas fluorescens* ARLS510, *Rhizobium* ÅB4, *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 314-2 och HRF3. Alla organismer tillsattes enskilt eller som mix förutom manitol och socker.

Gradering av tidig rotknölbildning (antal och storlek) på plantprover insamlade två månader efter sådd gjordes för att bestämma effekter av de olika behandlingarna. Tio plantor med rötter samlades in från alla försöksrutor i de två försöken i Östergötland respektive Västergötland. Efter insamling frystes rötterna vid -20 °C. Före gradering tinades rötterna i rumstemperatur och lades i kallt vatten.

Förekomst och storlek av rotknölar bestämdes på 3 cm av roten från övergången mellan stjälk och rot (markytan) och nedåt i en 5-gradig skala, där klass 1= inga rotknölar, klass 2=1 till 10 små knölar, klass 3=11 till 25 små knölar och klass 4=3-15 stora, friska knölar.

Effekten av de olika utsädesbehandlingarna på rotknölbildningen analyserades genom att summera andel plantor i klass 3 och 4. Inga signifikanta skillnader mellan behandlingarna kunde observeras. Sammantaget fanns inga skillnader i knölbildning mellan sorterna, medan knölbildningen var högre i försöket i Östergötland jämfört med Västergötland ($p < 0,0001$)

Sundhetstest och förekomst av utsädesburna skadesvampar i fröskörden

Sundhetstestet av fröskörden utfördes i växthus. Trettio frö per skördeprov från samtliga behandlingar såddes i plastskålar (4 upprepningar, 2 sorter, 16 behandlingar, 2 fältförsök=256 skålar). Uppkomst, andel sjuka plantor samt planttillväxt noterades för varje skål. Baserat på olika sjukdomssymtom togs 30 groddplantor ut för kartläggning av potentiella skadesvampar. För att kunna isolera så många som möjligt av förekommande utsädesburna svampar användes både färsk och frysta ytsteriliserade plantprover för isolering på potatis-dextros agar. Frysning av växtmaterial rekommenderas i litteraturen för att hindra tillväxten av snabbväxande ytkontaminanter och därmed gynna isolering av endofytiska utsädesburna svampar. PCR-baserade molekyllärometoder användes för identifiering av svamparna.

Sammanlagt erhöles 294 svampisolat som kunde indelas i 62 morfologiska grupper från färsk, ofrysta prover. Renodling av svampar från frysta prover resulterade i färre antal isolat, klassificerade i 17 olika morfologiska grupper (se tabell 1). Resultatet av isolering av svampar från frysta prover från Östergötland bedömdes inte vara tillförlitlig och presenteras därför inte här.

Tabell 1: Utsädesburna svampar isolerade från ytsteriliserade sjuka groddplantor av fröskörden 2014 före och efter frysning

| Fält | Behandling | Erhållna isolat | | Morfologiska grupper | Biotest (Tattoo) | Antal isolat med: | |
|----------------|---------------|-----------------|--------|----------------------|------------------|-------------------|----------------|
| | | Taifun | Tattoo | | | negativ effekt | positiv effekt |
| Väster-götland | Färsk prover | 61 | 91 | 62 | 61 | 18 | 15 |
| Öster-götland | Färsk prover | 70 | 72 | 53 | 54 | | |
| Väster-götland | Frysta prover | 16 | 26 | 17 | 19 | 7 | 3 |

Den sjukdomsalstande förmågan (patogeniciteten) hos isolaten undersöktes i ett biotest, där 30 åkerbönsfrö (sort Tattoo) såddes i skålar med lecakulor och perlitblandad växthusjord. En agarplugg med mycel från de olika svampisolaten lades tillsammans med två frön. Fröna fick gro i mörker vid 20 °C dag/15 °C natt under 10 dagar varefter grobarhet och sjukdomsförekomst registrerades. Sexton procent av svampisolaten som isolerats från färsk plantprover visade patogen effekt, medan 37 % av isolaten var skadliga bland de som renodlats från de frysta proverna. Motsvarande siffror för isolat som visade positiv effekt (snabbare uppkomst och mindre sjukdomsangrepp) var 13 % respektive 16 % (tabell 1).



Bild 1: Sänkt grobarhet och hämrad planttillväxt orsakade av svampar isolerade från fröskörden 2014



Bild 2: Sjukdomssymtom på rötter orsakade av svampar isolerade från fröskörden 2014

Samtliga patogena svampisolat från de fräska plantproverna identifierades som *Fusarium avenaceum*. Detta är anmärkningsvärt, eftersom isolaten skiljde sig morfologiskt, samt visade olika patogenicitet på åkerböna i biotestet (se tabell 2). Detta tyder på att flera stammar av *Fusarium avenaceum* förekommer i de fält där försöken genomfördes. Nya studier behövs för att klargöra hur viktig denna svamp är som patogen på åkerböna.

Tabell 2: Olika grader av hämmande effekt på grobarhet orsakade av utsädesburna svampar isolerade från fröskörden 2014 i biotest på åkerböna (sort Tattoo). Tabellen visar resultat från några utvalda isolat från olika morfologiska grupper med olika grader av skadlig effekt på åkerböna.

| Isolat id | Morfologisk grupp | % grobarhet |
|-------------|-------------------|-------------|
| Oinokulerat | - | 63 |
| F4 | 26 | 10 |
| FV18 | 6 | 23 |
| FV58 | 4 | 13 |
| FV31 | 20 | 20 |
| FV23 | 5 | 0 |
| FV21 | 10 | 17 |
| FV50 | 17 | 37 |

Även isolaten från de frysta proverna identifierades mestadels som *Fusarium* sp, men även andra svampar tillhörande släktena *Alternaria*, *Ascochyta*, *Ceratocystis* och *Stemphylium* observerades. Dessa svampsläkten är välkända växtpatogener på många av våra kulturväxter.

Förstudier av *Rhizobium*-stammar

Val av bakteriestammar

Våra undersökningar med *Rhizobium*-bakterier har hittills varit begränsade till ett fåtal bakteriestammar. Två av bakteriestammarna som använts i tidigare undersökningar (ÅB4 och ÅB17) har visat sig svåra att identifiera trots flera olika ansatser. DNA-sekvensering visade 95% matchning med både *Rhizobium* och *Agrobacterium*. I detta projekt ville vi jämföra effekterna av ÅB4 och ÅB17 med rhizobie-stammar. Förhoppningen var att ÅB4 och ÅB17 skulle vara mera kompatibla och effektiva eftersom de isolerats från åkerböna.

För denna studie användes även befintliga rhizobiumsamlingar vid SLU. Olika stammar från dessa samlingarna odlades upp och identifierades med klassiska metoder baserad på specifika odlings-substrat (bild 3 och 4). Dessa två odlingsmedier används för att urskilja rhizobier från andra närbesläktade bakterier såsom *Agrobacterium*. Vi kunde dock inte bekräfta specificiteten hos dessa odlingsmedier, se tabell 3. Identifieringen kompletterades med DNA-baserad sekvensering.



Bild 3. YMA med kongo röd för att urskilja vita rhizobier från två ickerhizobier

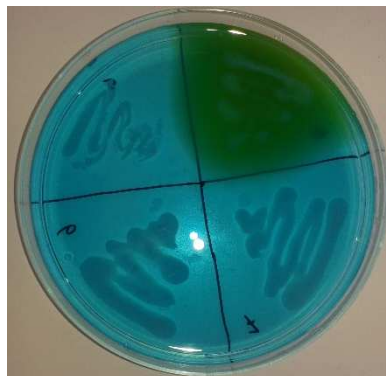


Bild 4. En *Agrobacterium* (gul blå) och 3 rhizobier på laktosagar.

Screening av *Rhizobium*-stammar i växthusförsök

Trettio rhizobie-stammars effekter på åkerböna undersöktes i växthusförsök (sort Tattoo, natt respektive dag temp 15-20 °C). Det utsädesparti som användes i försöket bar på naturlig smitta. Framtagning av inokulum och ympning av frön utfördes enligt våra utarbetade metoder. Bakterieberade frö såddes i plastskålar (18 cm diameter x 4 cm djup) med lecakulor (6 frö/skål och 2 skålar per bakteriebehandling). Avläsningar av uppkomst, planttillväxt och antal friska kväveknölar gjordes en månad efter sådden.

Tabell 3. Screening av 11 nyisolerade och 19 tidigare isolerade rhizobier avseende deras effekter i Totto i växthus. Resultat från 6 stammar redovisas här.

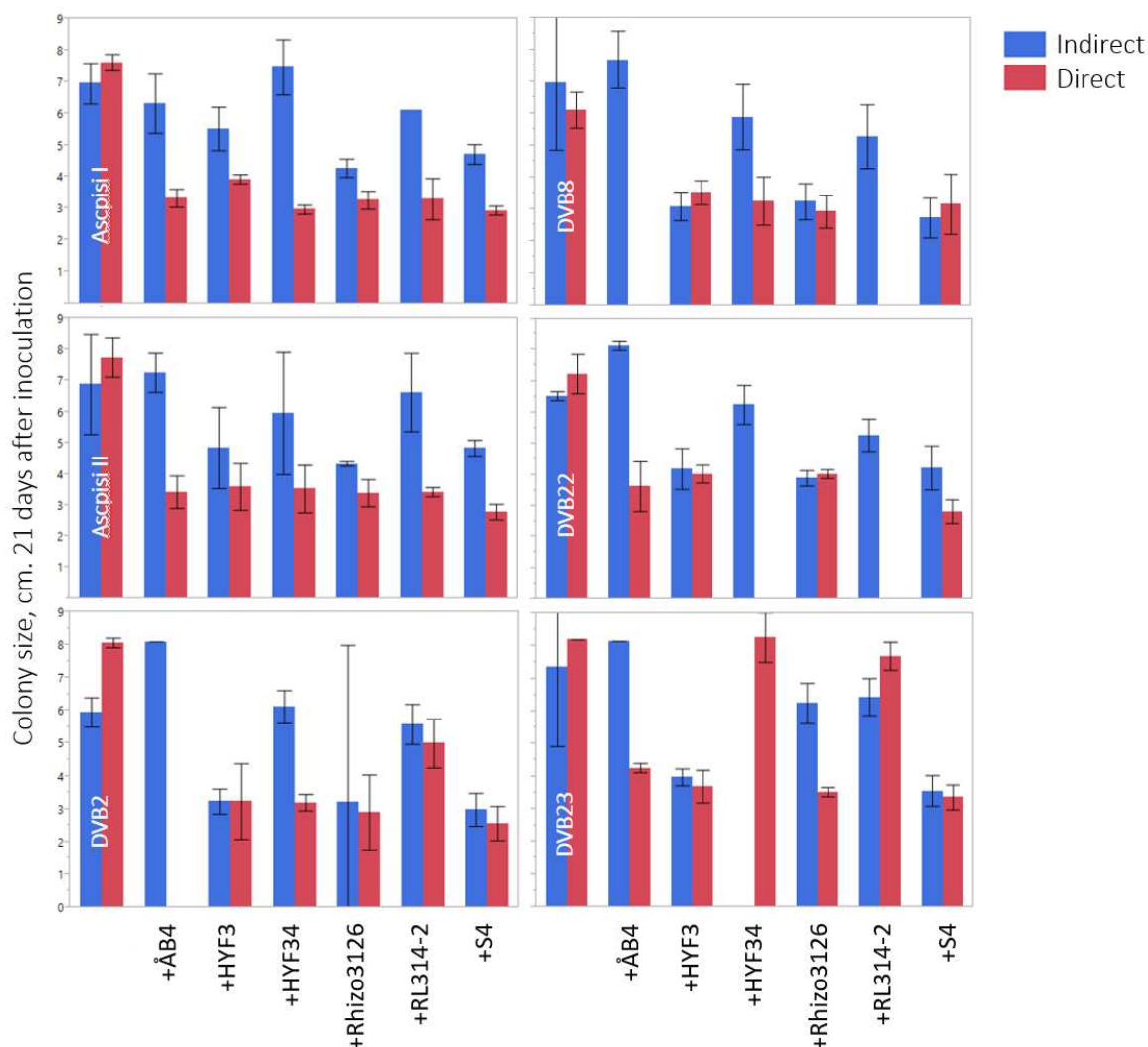
| Rhizobiestam | Källa | Röd YMA | Lactose Agar (- rhizobium) | Antal grodda av 12 | Plant längd (cm) | Plant torrsvikt (g) | Antal friska N_knölar |
|-----------------|--------------------|---------|----------------------------|--------------------|------------------|---------------------|-----------------------|
| Kontroll | - | | | 5 | 65 | 3,1 | 0 |
| Rhizobium 3126 | baljväxt | vit | + | 12 | 63 | 5,5 | 0 |
| Rhizobium 3174 | baljväxt | röd | - | 3 | 60 | 1,95 | 8 |
| Rhizobium HYF3 | Åkerböna (Fuego) | vit | - | 10 | 69 | 5,2 | 37 |
| Rhizobium HYA34 | Åkerböna (Aurora) | vit | - | 8 | 66 | 4,2 | 44 |
| Rhizobium HYF54 | Åkerböna (Fuego) | vit | + | 6 | 69 | 3,4 | 10 |
| Rhizobium HRA31 | Åkerböna (Aurora) | rosa | - | 1 | 44 | 0,26 | 0 |

Endast ett fåtal av de 30 testade bakteriestammarna gav positiva effekter på åkerböna; *Rhizobium* 3126 (tillhörande den gamla rhizobiumsamlingen, ursprung okänt), *Rhizobium* HYA34 och *Rhizobium* HYF3. HYA34 och HYF3 isolerade från kväveknölar på åkerböna (Hnin 2014). Även negativa effekter noterades efter behandling med vissa rhizobier (t.ex. HRA31, data ej visat). Huruvida de observerade effekterna är sortberoende undersöktes inte inom ramen för projektet.

Rhizobiernas förmåga att hämma åkerbönans skadesvampar jämfört med PGPB.

Fem rhizobie-stammarna, utvalda baserat på resultat från olika förstudier, samt en tillväxtfrämjande bakterie (S4, *Serratia proteamaculans*) vald på grund av sin dokumenterade patogenhämmande förmåga (Neupane *et al*, 2013; Akther, 2014) användes i in vitro-tester för att undersöka deras förmåga att hämma myceltillväxt hos fyra svampisolat vilka visat skadlig effekt i sundhetstestet beskrivet ovan, samt två tidigare renodlade isolat av *Ascochyta*, en känd patogen på åkerböna.

Bakteriernas både indirekta (orsakad av volatila ämnen) och direkta (orsakad av diffunderbara ämnen) hämningsförmåga bestämdes. Resultaten framgår av figur XX, och visar bakteriernas breda hämmande effekt. Framför allt hämning orsakad av utsöndring av svamphämmande ämnen och/eller näringskonkurrens (Direct=direkt effekt) kunde konstateras i försöken. Alla bakterier gav signifikant hämning av alla svampisolat, förutom DVB23 i testerna av direkt effekt. Den indirekta effekten varierade mer beroende på bakterie/svampkombination (figur 1).



Figur 1 . Resultat av laboratorietest av olika bakteriestammars hämmande effekt på sex olika svampisolat med skadlig effekt på åkerböna: Ascpisi I och II är två isolat av Ascochyta, medan DVB2, 8, 22 och 23 är isolat från skördeprover av åkerböna. Indirect = effekt av volatila ämnen utsöndrade av bakterierna, direct=effekt av diffunderbara ämnen och näringskonkurrens. Felstaplarna anger 95% konfidensintervall.

Undersökningar i fält år 2015

Fältförsöksplan 2015

Baserat på resultat vunna under 2014 och 2015 års undersökningar valde vi i att för 2015 års fältstudier använda *Rhizobium*3126, HYA34, HYF3, ÅB4 och *Rhizobium leguminosarum* 314-2 för att studera effekterna av dessa stammar enskild och i saminokulering med S4 (*Serratia proteamaculans*). Försöksplanen kom att bestå av tolv behandlingar (se tabell 4).

Tabell 4. De olika behandlingarna i två fältförsök med utsädesympning av åkerböna genomförda i Södermanland (Västerås) respektive Östergötland (Klockrike) under 2015, och antal levande bakterier per frö efter betning.

| Behandling | Bakterier/frö | |
|--|-----------------|-----------------|
| | Aurora | Tattoo |
| 1. Ingen (Kontroll) | 70 | 0 |
| 2. <i>Rhizobium</i> 3126 | 1×10^4 | 1×10^5 |
| 3. <i>Rhizobium</i> HYA34 | 2×10^3 | 2×10^5 |
| 4. <i>Rhizobium</i> HYF3 | 4×10^3 | 1×10^5 |
| 5. <i>Rhizobium leguminosarum</i> 314-2 | 7×10^3 | 5×10^3 |
| 6. <i>Rhizobium</i> ÅB4 | 4×10^4 | 2×10^5 |
| 7. <i>Serratia</i> S4 | 2×10^3 | 6×10^3 |
| 8. <i>Rhizobium</i> 3126+S4 (1:1) | 6×10^3 | 5×10^4 |
| 9. <i>Rhizobium</i> HYA34+S4 (1:1) | 2×10^3 | 1×10^5 |
| 10. <i>Rhizobium</i> HYF3+ <i>Serratia</i> S4 (1:1) | 3×10^3 | 5×10^4 |
| 11. <i>Rhizobium leguminosarum</i> 314-2+ <i>Serratia</i> S4 (1:1) | 4×10^3 | 6×10^3 |
| 12. <i>Rhizobium</i> ÅB4+S4 (1:1) | 2×10^4 | 1×10^5 |

Åkerbönssorterna Tattoo (grobarhet 70 %) och Aurora (grobarhet 90 %) användes i fältförsöken. Båda sorterna bar på utsädessmitta av *Ascochyta* (10 % smittade frön i Tattoo, 2 % smittade frön i Aurora). Utsädet till fältförsöken behandlades med de olika bakteriestammarna enskilt och i blandning med metoder framtagna i vårt laboratorium. Antal levande bakterier efter betningen bestämdes genom att skaka betade frön i en fosfatbufferlösning (5 frö i 10 ml, n=2), följd av spädningsserier på varje suspension och spridning på ett lämpligt odlingssubstrat, se tabell 4. I kontrollet användes obehandlat utsäde (bild 5-6). Bakteriebetingning hade inte någon negativ inverkan på grobarhet enligt sundhetstestet utfört i växthusmiljö (data ej visat).



Bild 5. Obehandlat åkerbönsfrö



Bild 6. Bakteriebehandlat åkerbönsfrö

Försöken anlades i Södermanland (Västerås) respektive Östergötland (Klockrike) som fullständigt randomiserade blockförsök med fyra upprepningar. Parcellstorleken var 20 kvm (skördeyta 15 – 17 kvm). Skillnaderna i odlingsjordens egenskaper var små mellan de två försöksplatserna, se tabell 5.

Tabell 5. Odlingsjordens egenskaper vid de två försöksplatserna.
A = Södermanland, B = Östergötland.

| | | P-AL | KI | K-AL | KI | Mg-AL | K/Mg-AL | | Ca-AL | | Al-AL |
|-------|-------|---------|----|---------|----|---------|---------|------|---------|------|---------|
| Plats | pH | mg/100g | | mg/100g | | mg/100g | | | mg/100g | | mg/100g |
| A | 6.3 | 3.6 | II | 29.7 | IV | 47.9 | 0.6 | | 238 | | 26 |
| B | 7,0 | 16,9 | V | 21,3 | IV | 24,1 | 0,9 | | 455 | | 32 |
| | | P-HCl | KI | K-HCl | KI | Cu-HCl | Mull | Ler | Silt | Sand | Jordart |
| Plats | Fe-AL | mg/100g | | mg/100g | | mg/Kg | % | % | % | % | |
| A | 77 | 59.2 | 3 | 372,6 | 4 | 20.7 | 4.2 | 29 | 47.5 | 19.3 | mmh ML |
| B | 28 | 71,2 | 4 | 245,2 | 4 | 17,3 | 5,0 | 33,6 | 46,9 | 14,5 | mmh ML |

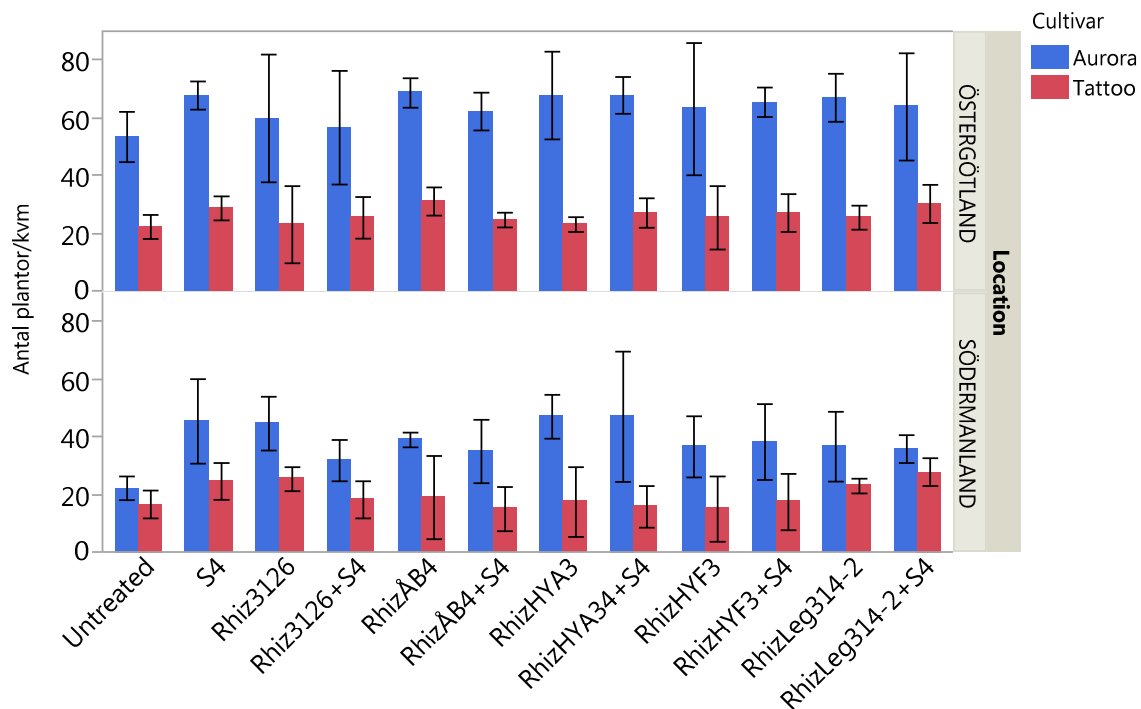
Effekter av behandlingarna på uppkomst av åkerböna

Fem veckor (Södermanland) respektive åtta veckor (Östergötland) efter sådd bestämdes antal uppkomna plantor och 10 plantor med pålrot samlades in i alla parceller. Plantproverna graderades för förekomst av kväveknölar på pålroten och i möjligaste mån graden av rotinfektion.



Bild 7. Fältförsöket i Södermanland 2015 med åkerbönsorterna Aurora och Tattoo efter bakteriebetning av utsädet: Bilden visar klara skillnader i uppkomst mellan olika behandlingar.

Generellt sett fanns stora skillnader i uppkomst mellan sorterna (figur 2 bild 7). Sammantaget över alla behandlingar var uppkomsten av Aurora signifikant bättre än av Tattoo i båda försöksfälten. Inga skillnader mellan behandlingarna kunde observeras i försöket i Östergötland. I Södermanlandsförsöket gav flertalet bakteriebehandlingar (både rhizobier och/eller *Serratia*) ett signifikant större antal uppkomna plantor av sorten Aurora jämfört med obehandlat, och även i Tattoo gav vissa behandlingar förbättrad uppkomst.



Figur 2 . Antal uppkomna plantor per m² fem veckor (Östergötland) respektive åtta veckor (Södermanland) efter sådd av bakteriebetad åkerböna i fältförsök. Felstaplarna anger 95% konfidensintervall.

Effekter av behandlingarna på rotknölbildning

I Östergötlandsförsöket graderades knölbildning genom att bestämma andel plantor i klasser med; 1-20, 20-40 respektive >40 friska rotknölar på den övre delen av pålroten. I Södermanlandsförsöket, som provtogs senare, bestämdes andel plantor i klasser med; 0 rotknölar, 1-10 små knölar, 5-10 stora knölar respektive >10 stora friska rotknölar. Generellt var knölbildningen bättre i Aurora än i Tattoo (Östergötland $p=0,0026$, Södermanland $p=0,0893$). Inga signifikanta skillnader mellan utsädesbehandlingarna kunde konstateras i försöken.



Bild 8. Kväveknölar på pålroten i åkerböna

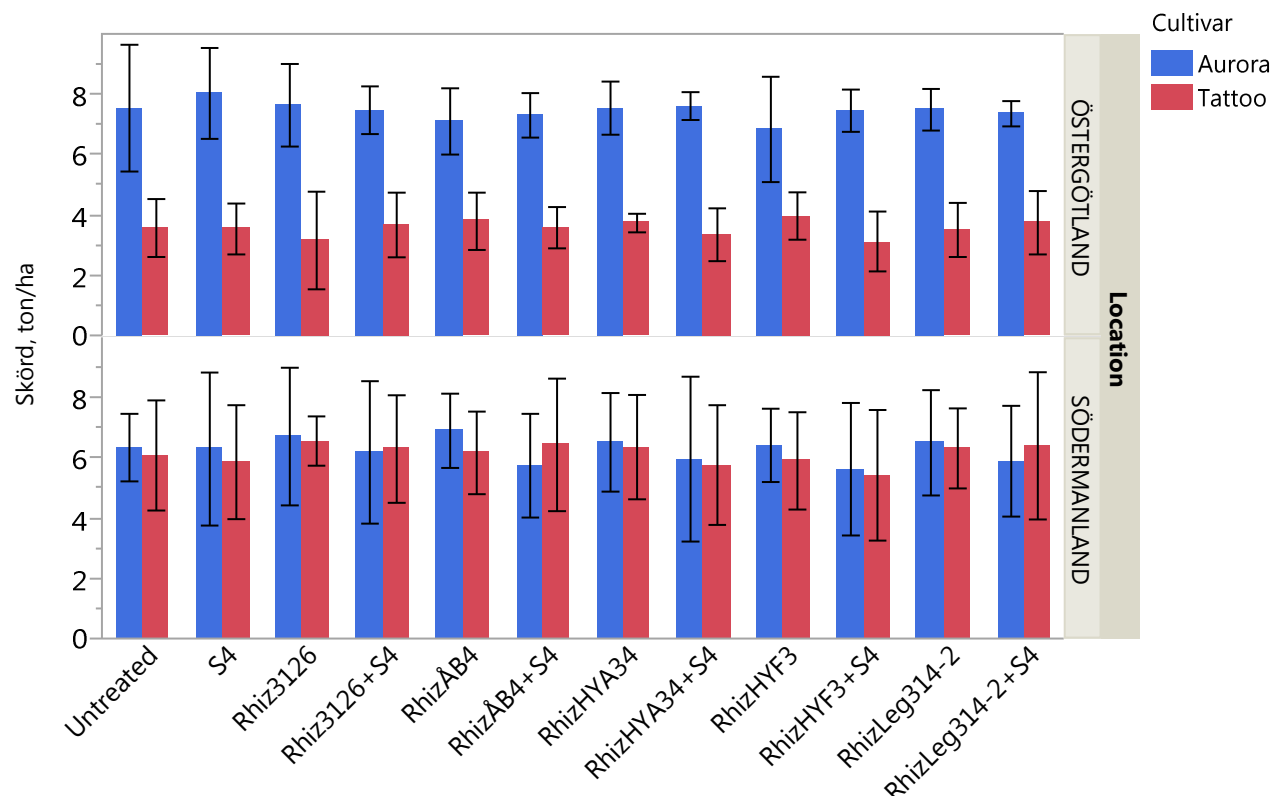
Effekter av behandlingarna på rotinfektion

Graderingen av rotinfektion gjordes genom att bestämma antalet plantor med missfärgade eller döda rötter. Andelen friska rötter (utan missfärgning) var signifikant högre i Aurora jämfört med Tattoo i

båda försöken (Södermanland, p-värde 0,0159; Östergötland, p-värde 0,0077). Inga signifikanta effekter av utsädesbetning med de olika bakterierna på andelen friska rötter kunde dock observeras.

Effekter av behandlingarna på skördenivå

Hektarskördarna var höga i försöken. Inga statistiskt säkra skillnader mellan de olika utsädesbehandlingarna kunde observeras i försöken 2015. Aurora gav i medeltal över alla behandlingar nära 4 ton/ha högre skörd än Tattoo i Östergötland ($p > 0,0001$). I Södermanlandsförsöket fanns inga säkra skillnader mellan sorterna. Skördenivån skilde också mellan försöksplatserna. I Östergötland gav Aurora högst skörd ($p > 0,0001$) jämfört med Södermanland, medan Tattoo gav högre skörd i Södermanland än i Östergötland ($p > 0,0001$).



Figur 4. Skörd av åkerböna i fältförsök med utsädesbetning med bakterier år 2015. Felstaplarna anger 95% konfidensintervall

Sammanfattning av resultaten från 2015

De bakteriellstammar som valdes ut för att ingå i fältförsöken 2015 visade en bred hämmande förmåga på svampisolat med skadlig effekt på åkerböna i in vitro-tester. Under fältförhållanden gav flera av utsädesbehandlingarna en förbättrad uppkomst i ett av fältförsöken. Samma tendens kunde ses även i det andra försöket, men skillnaderna var inte statistiskt signifikanta. Inga effekter av behandlingarna observerades avseende rotnölbildning eller angrepp av rotpatogener. Skördenivån var genomgående hög i försöken, men påverkades inte av utsädesbehandlingarna. Saminokulering av rhizobier och tillväxtfrämjande bakterier visade inga tydliga synergistiska effekter, vare sig i försök under kontrollerade förhållanden eller i fält.

Verksamhet under 2016

Under 2016 kommer vi att fokusera våra studier på optimering av behandlingseffekter av utsädesympning med rhizobier och PGPR av åkerböna. Effekterna av de olika behandlingarna kommer att dels utvärderas i växthusförsök och laboratorium, men främst i ett fältförsök.

Baserat på resultaten från 2014 och 2015 års studier kommer vi att prioritera bakteriestammarna *Rhizobium* 314, *Rhizobium* 3126, HYA34, ÅB4. Dessa stammar kommer liksom under 2015 att användas för ympning med respektive utan inblandning av en tillväxtfrämjande bakterie (S4). Ett utsädesparti av sorten Tattoo, med naturlig utsädessmitta används i studierna i växthus och fält för att bestämma behandlingarnas effekter på uppkomst, sjukdomsförekomst och skördenivå.

Behandlingen av utsädet för fältförsöken 2015 gav lågt och ojämnt antal bakterier per frö. Detta i kombination med eventuella skillnader i överlevnad efter sådd av de olika bakterierna kan ha påverkat resultaten i fältförsöken. Under 2016 kommer vi därför att vidareutveckla ympningstekniken för att säkerställa en större och jämnare tillförsel av bakterier. Vi planerar också att i växthus studera förmågan hos de utvalda rhizobie-stammarna att koloniserar åkerböna, och hur konkurrenskraftiga dessa stammar är vid samympning med S4. Hittills har rhizobie-stammarna och PGPR-bakterien blandats i lika proportioner vid samympningen. Baserat på resultaten tidigare försök och från de nu planerade etableringsstudierna kommer vi att behandla utsädet till fältförsöket med olika andelar rhizobier och PGPR. Kartläggning av fröburna svampar i skördeprover från 2015 kommer att genomföras med molekylära metoder. Speciellt förekomst av *Fusarium avenaceum* är intressant.

En viktig del av verksamheten under 2016 är att sammanställa resultaten från hela projektiden för slutrapportering och publicering

Resultatspridning

Resultat erhållna presenterades på Jordbruksverkets FoU dagar i Hässleholm den 4 mars 2015, och en ny presentation planeras till FoU dagar i oktober 2016.

Referenser

- Akhter, Shirin, 2014. Interactions between *Rhizobium*, antagonistic bacteria and fungal pathogens in faba bean. Second cycle, A2E. Uppsala: SLU, Dept. of Forest Mycology and Pathology, Uppsala, Sweden. (30hp)
- Hnin E.P. 2014. Nodule-inhabiting bacteria and the effect of root micro-organisms on faba bean, *Vicia faba*. Project work in biology I BG367 (15hp)