

Årsrapport och verksamhetsplan för 2015 för forskningsprojektet:

SKÖRDEÖKNING OCH ODLINGSSÄKERHET I PROTEIN-GRÖDAN ÅKERBÖNA (*VICIA FABA*) GENOM UTNYTTJANDET AV SYNERGISM MELLAN RHIZOSFÄR-BAKTERIER

S. Alström och B. Andersson

Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi, SLU, Uppsala

BAKGRUND

Projektet (2013-14) avser att bidra med kunskap och miljövänliga verktyg för en förbättrad odlingssäkerhet i åkerböna genom att studera synergieffekter mellan symbiotiska rhizobier och icke-symbiotiska antagonistiska rotbakterier (Plant Growth-Promoting Bacteria, PGPB). Vår hypotes är att de positiva effekterna av *Rhizobium* kan stärkas i samspel med PGPB och att detta samspel har potential att minska patogenangrepp i åkerböna under växtsäsongen och härigenom även problemen med fröburen smitta. Projektet är huvudsakligen finansierat av Ekagastiftelsen.

Undersökningarna omfattar studier av:

1. stjälk- och rotangrepp i åkerböna och isolering av svamppatogener på åkerböna i tidiga plantstadier
2. rotnölbildning i relation till stjälk- och rotangrepp i åkerböna
3. skillnader i sjukdomsangrepp och nölbildning mellan olika sorter av åkerböna
4. effekten av olika isolat av *Rhizobium* och PGPB på planttillväxt, N-fixering och patogenhämning i åkerböna
5. effekter av enskildinokulering och blandinokulering av *Rhizobium* och PGPB i växthusförsök
6. effekten av de bästa behandlingarna i punkt 4 i jämförelse med kommersiella preparat i fältförsök.

UNDERSÖKNINGAR GENOMFÖRDA ÅR 2014

Projektarbetet har fortskridits som planerat under året 2014 främst med fokus på punkter 1, 4, 5 och 6. Undersökningarna utfördes på naturlig förekommande bakteriestammar tillhörande *Rhizobium* (*R. leguminosarum* 314-2) och PGPB *Pseudomonas* (*P. fluorescens* ARLS 510), *Serratia* (*S. plymuthica* och *S. proteamaculans* (Neupane et al 2013, opublicerat) och minst en sort. Bakterierna härstammar från olika växtarter. Två bakteriestammar (ÅB4 och ÅB17), isolerade från åkerböna och preliminärt identifierade som *Rhizobium* spp., samt ett kommersiellt *Rhizobium*-preparat med (Hovmanstorp, rekommenderad för ympning av trädgårdsböna) togs med i studien. *Pseudomonas* och *Serratia* ingick som PGPB i studierna på grund av deras potential att förbättra uppkomst, minska sjukdomsangrepp och höja skörden i potatis och raps (Alström och Andersson 2011, 2012).

Kompatibilitet mellan rhizobier, PGPB och åkerböna

I denna delstudie användes två rhizobiestammar, ÅB4 och *R. leguminosarum* 314-2 samt två stammar, ARLS510 (*P. fluorescens*) och S4 (*S. proteamaculans*). Stammarna valdes på grund av de nyligen visat förmåga att hämma tillväxt av bönpatogener tillhörande *Ascochyta*, *Botrytis* och/eller *Fusarium* i *in vitro* studier (Akhter 2014). För att optimera behandlingseffekter i åkerböna undersökte vi om bakteriestammarna var kompatibla med varandra och med åkerböna. För att få en bild av kompatibilitet/konkurrensförmåga hos de två bakteriegrupperna utfördes ett växthusförsök

där fyra bakteriestammar tillfördes enskilt respektive som blandymp på frö av två sorter, Aurora (en landsort) och Fuego (en mätarsort). Fröna sköljdes i rinnande kranvatten ordentligt före bakterietillförseln i syfte att minimera den störande effekten från naturligt förekommande utsädesburen ytmikrofloran. Fröna såddes i vermikulit. Mängden bakterier per gram torr rotvikt uppmättes i samtliga behandlingar två veckor efter sådden på odlingssubstrat specifika för olika bakterier och jämfördes därefter med totalantal bakterier i rötterna. Denna approach gav tillförlitliga resultat och visade att både rhizobierna och PGPB koloniserade åkerbönrötter både då de inokulerades enskilt eller som blandymp. Koloniseringsgrad varierade dock mellan bakteriestammar och sorter. Båda PGPB påvisades potential att stimulera rhizobiumkolonisering i båda sorterna. (Akhter, 2014). Bakterien *S. proteamaculans* S4, vars genom numera är sekvenserat (Neupane, 2013), påvisades vara överlägset på att rotkolonisera båda åkerbönsorter trots att den härstammar från åkerfräkenrötter.

Bakterieinverkan på åkerböna

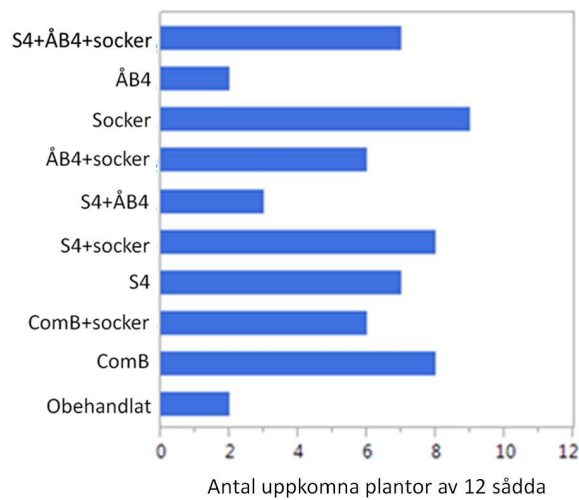
Resultat ovan användes som underlag till nya växthusförsök för att underöka bakteriernas inverkan på åkerbönsans uppkomst, planttillväxt, knölbildning och sjukdomsangrepp. Två försök utfördes med sorterna Aurora och Fuego i det första och sorten Columbo i det andra försöket.

I det första växthusförsöket med Aurora and Fuego (utsädet från Eurofins) behandlades fröna i tre timmar med färskodlade bakterier och såddes (n=6, 2frö/kruka) i substratmix (Leca-kulor, 8-12 mm, Leca Weber, Saint-Gobain och fältjord, 3:1). Fältjord var en mmh mj LL (pH 6.1, mullhalt 4.8 %, lerhalt 16 %, silt 56 % och sand 23.2 %) från ett ekologiskodlat åkerbönfält i Vara, Västra Götaland. I en pilotstudie med socker tillfört som tillsats med *Rhizobium* uppmätte vi ett ökat antal kväveknölar i sockerbehandlade åkerbönplantor jämfört med i obehandlade. Behandling med socker (0.5% sukros) som tillsats togs därför med också i studien eftersom sockret anses fungera som en signalmolekyl som kontrollerar genuttryck och utvecklingsprocesser hos diverse organismer inklusive växter. Sammanlagt 10 olika behandlingar/sort ingick i försöket. S4 (*Serratia*), ÅB4 (*Rhizobium*) och ett kommersiellt preparat (kallas ComB i dennas studie) användes för enskild respektive samympning med och utan tillsats av socker. ComB tillfördes enligt tillverkarens rekommendationer, vilket innebar att cellhalten vid fröbetning med preparatet inte var desamma som i leden med bakteriebehandlingar. Uppkomst, skottlängd, antal sjuka plantor registrerades under 2 månader och därefter bestämdes antal knölar, knölvikt och plantvikt i samtliga led. Angrepp på rötter/stjälkar bedömdes enligt en 5-gradig skala. *Rhizobium* cellhalt, sammansättning och identitet av bakteriefloran i det kommersiella preparatet undersöktes senare.

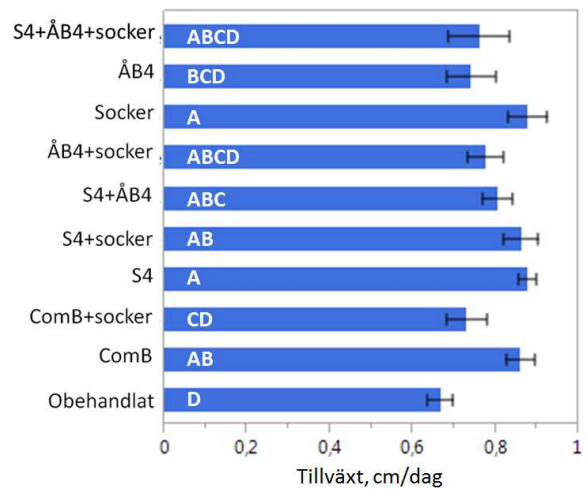
I det andra försöket användes sorten Columbo med naturlig fröburen smitta av *Ascochyta* sp. (17 %). Färskodlade rhizobiebakterier av stammarna ÅB4, *R. leguminosarum* 314-2, samt PGPB-stammarna ARLS510 and S4 suspenderades i en fosfatbufferlösning och fröna behandlades i 3 timmar med enskilda bakteriestammar eller en bakterieblandning innan de såddes (2 frö/kruka, och n=8) i en blandning (3:1) av små Leca-kulor (2-6 mm storlek, Leca Weber, Saint-Gobain) och γ -steriliserad fältjord från Ultuna (pH 7.8, organisk substans 2.1%, lera 0.4%, silt 21.1% och sand 76.4%). Försöket pågick i 10 veckor och behandlingarnas effekter på uppkomst, torr plantvikt, rotinfektion, antal friska knölar och torr knölvikt registrerades.

I första växthusförsöket, tillsatsen av flesta behandlingar vid sådden förbättrade frönas grobarhet (Figur 1) i Aurora men inte i Fuego (data ej visat). Behandlingarnas positiva inverkan registrerades även på plantvikt och färskvikt av kväveknölar i Aurora (Figur 3) men inte i Fuego (data ej visat). Planttillväxtens hastighet var signifikant högre än kontrollen i Fuego (Figur 2) som resultat av flesta bakteriebehandlingarna. Den positiva effekten av ComB dock kunde inte förklaras med

bakterieeffekter i och med att varken *Rhizobium* spp. eller någon annan mikro-organism hittades i preparatet trots upprepade försök.



Figur 1. Inverkan av rhizobiestammen ÅB4, PGPB-stammen S4 och ett kommersiellt preparat (ComB) med och utan tillsats av socker på uppkomst på åkerbönfrö (sort Aurora).



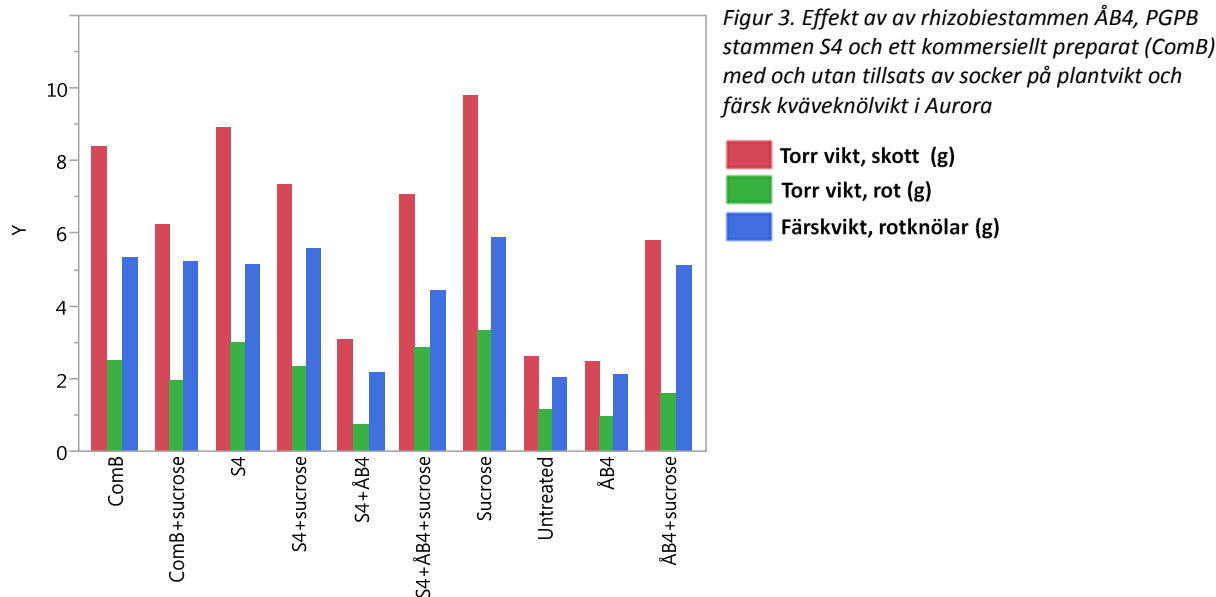
Figur 2. Inverkan av rhizobiestammen ÅB4, PGPB-stammen S4 och ett kommersiellt preparat (ComB) med och utan tillsats av socker på tillväxthastighet i åkerbönfrö (sort Fuego).

Strecken representerar medelfelet. Staplar med olika bokstäver är signifikant åtskilda. (Student's *t*, $p < 0.05$).

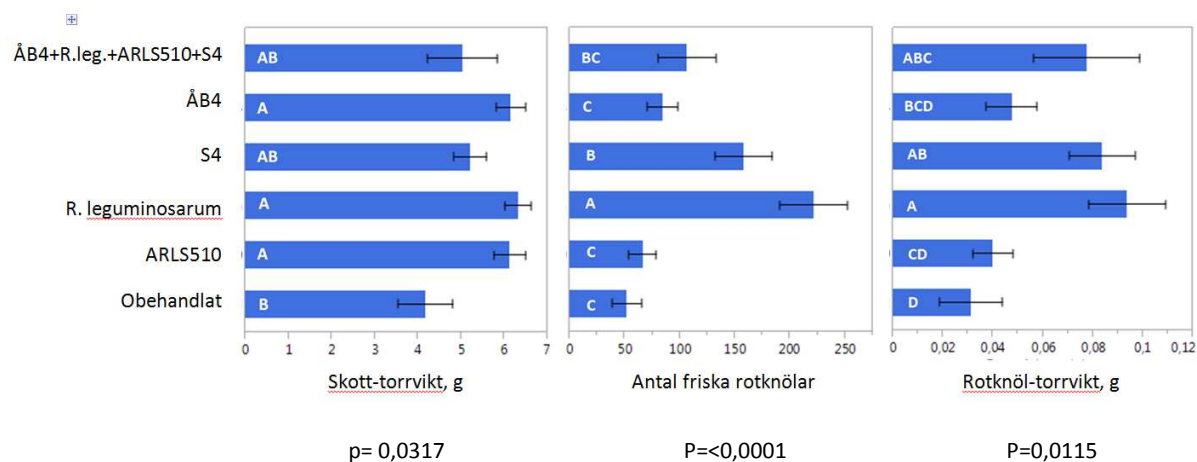
Inverkan av enbart socker vid sådden gav en förbättrad uppkomst i Aurora (Bild 1) och en signifikant högre tillväxthastighet i Fuego (Figur 2). Sortskillnader i responsen på grund av tillsatsen har en möjlig förklaring i skillnader i utsädeskvalitet och därmed mikrosamhällets struktur och sammansättning generellt men även specifikt (Bild 1).



Bild 1. Effekt av socker på uppkomst och tillväxt i åkerbönfrö (sort Aurora). Kontroll nedre raden. ($n=6$, 2frö/ kruk)



Resultaten från det andra växthusförsöket på sorten Columbo framgår av figur 4. Ingen signifikant skillnad fanns mellan enskild och blandympling vilket tyder på att ympning med en rätt sorts enskild bakteriestam kan vara lika bra eller till och med bättre än en blandning. Ympning med rhizobierna; ÅB4 eller *R. leguminosarum* gav en signifikant förbättrad planttillväxt (18 %, data ej visat), skott torr vikt (47 % respektive 50 %), jämfört med i kontrollen. Behandling med *R. leguminosarum* 314-2 gav störst knölbildning (uppmätt som antal knölar +325 % och deras torrsvikt + 203 %) men även PGPB, *S. proteamaculans* S4 stimulerade knölbildning (uppmätt som antal knölar + 204% och deras torrsvikt + 171%) jämfört med kontroller utan att ha någon negativ inverkan på plant tillväxt. En tendens till stimulering av skottvikt, knölbildning och knölvikt observerades även vid blandympling av de fyra bakterierna. Ytterligare undersökningar behövs för att dra säkra slutsatser.



Figur 4. Inverkan av två rhizobiestammar (ÅB4 och *R. leguminosarum* 341-2) och två PGPB stammar (S4 och ARLS 510) på skottvikt, antal friska knölar och knöl-torrsvikt i åkerböna (sort Columbo) efter behandling med en bakteriestam respektive blandning av olika stammar. N=8, 2 frö/kruka. Strecken representerar medelfelet. Staplar med olika bokstäver är signifikant åtskilda (Student's t, $p < 0.05$).

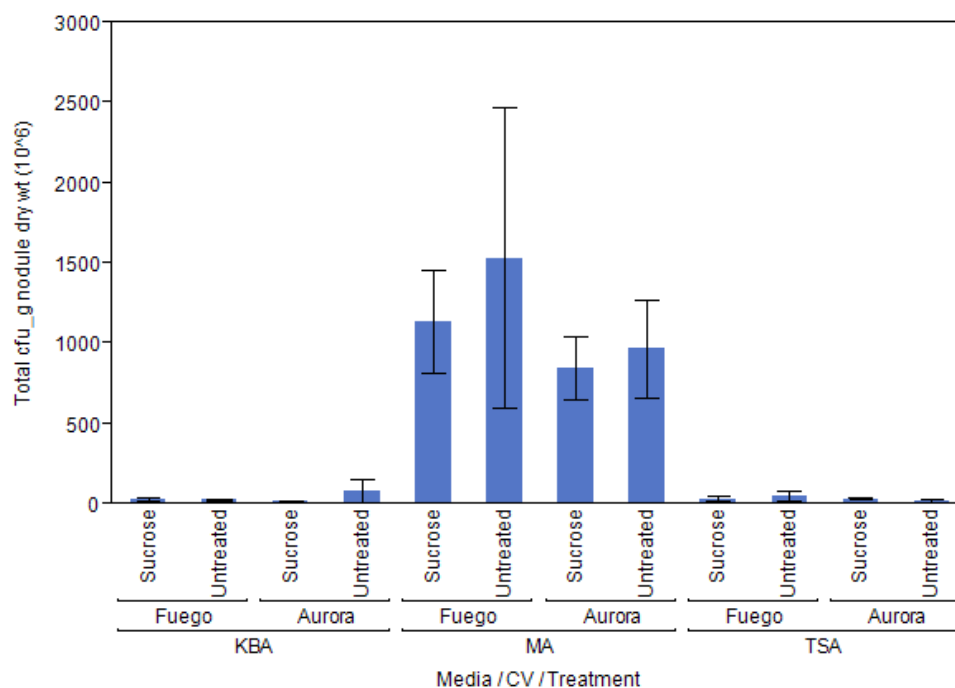
Tillsatsens inverkan på bakteriesamhällen i åkerbönans kväveknölar

För att förstå de bakomliggande orsakerna till förbättrad uppkomst i sockerbehandlade led gjordes jämförande studier av rotknölar från sockerbehandlade och kontrollplanter av åkerböna avseende andelen *Rhizobium* i relation till övriga bakteriesamhällen. Studier i det avseende saknas för

åkerböna men liknande studier på vilda *Vicia* spp och andra legymväxter visar tydligt att kväveknölar innehåller icke-rhizobier (Lei et al 2008, Narula et al 2012).

Endast odlingsbara (cultivation-dependent) bakteriesamhällen undersöktes i denna studie då *Rhizobium* spp. är odlingsbara. Syftet var således att ta reda på enbart tillsatsens inverkan andelen rhizobier i relation till övriga bakteriesamhällen, samt vilka andra bakterier utöver rhizobier som koloniserar åkerbönsans kväveknölar. Studien ledde också till isolering av nya rhizobiestammar som potentiellt skulle vara effektivare genom att de är naturligt anpassade till åkerböna. Bakteriesamhällen i kväveknölar analyserades med hjälp av tre olika odlingssubstrat. Mängden bakterier per gram torr knölvävnad samt förhållandet mellan rhizobier respektive icke-rhizobier i knölar från socker-behandlade respektive kontrollplantor i två sorter bestämdes.

Resultaten är sammanställda i Figur 5 och tabell 1 och visar på betydelsen av valet av odlingssubstrat när man vill bestämma mängd bakterier i knölvävnad. Tre odlingsmedier, Mannitol agar(MA), Kings Medium B agar (KBA) och Tryptic soy agar är lämpade för att odla bakterier men är delvis specifika. MA innehåller mannitol och gynnar rhizobium tillväxt medan Kings Medium B agar innehåller proteos pepton och glycerol, och gynnar tillväxten av fluorescerande *Pseudomonas* arter. Mängden totala bakterier per gram knölvävnad skilde sig inte mellan sorterna eller mellan behandlingarna men MA visade sig bäst för att bestämma totala mängden bakterier i kväveknölar av tre olika odlingsmedier som testades. Tillväxten av rhizobier var möjlig även på KBA och TSA vilket underlättar våra framtida studier.



Figur 5: Mängd bakterier (cfu/g knölvikt) i kväveknölar från socker-behandlade Aurora och Fuego plantor jämfört med i kontrollplantor på tre olika odlingssubstrat KBA, MA och TSA. Strecken anger medelfelet.

Med den odlingsbara ansatsen erhöles sammanlagt 320 olika bakterieisolat från kväveknölar. Av dessa kunde 255 isolat identifieras med hjälp av DNA-baserade molekylära metoder.

Tabell 1 visar fördelning av samtliga 320 isolat på sort och behandlingen. Åkerbönsknölar sett generellt visade en hög bakteriediversitet och innehöll bakterier från total 15 olika familjer. Av de 255 identifierade isolaten tillhörde dock endast 40 Rhizobiaceae (16 %). Tolv rhizobier isolerades från kontrollplantor av Fuego, medan inga rhizobier hittades på kontroller av Aurora. Inverkan av

socker på bakteriesamhällstrukturen var tydligt, främst i Aurora där antalet familjer ökade från 8 till 12 familjer efter sockerbehandling.

Bakteriefamiljen Pseudomonadaceae dominerade båda sorterna, och de flesta isolaten identifierades som fluorescerande *Pseudomonas* spp. Andelen Pseudomonadaceae var lägre i sockerbehandlade än i kontrollplantor. En annan överraskning var att bakterier tillhörande familjen Enterobacteriaceae inte hittades i knölar från kontroll. Deras andel ökade dock kraftigt till följd av sockerbehandlingen. Bakteriestammar tillhörande Pseudomonadaceae och Enterobacteriaceae t.ex. *Serratia* spp. och fluorescerande *Pseudomonas* spp. är välkända för sin positiva inverkan på växternas tillväxt och biokontroll effekter mot flertal växtpatogener. (Alström och Andersson 2011, 2012).

Tabell 1. Andel bakteriestammar (utav total 320) inom en bakteriefamilj som fanns i Aurora och Fuego med och utan sockerbehandling

Familj	Aurora				Fuego			
	Kontroll	% total	+Socker	% total	Kontroll	% total	+Socker	% total
Pseudomonadaceae	9	32.1	17	16.7	15	20.5	17	14.5
Fluorescent <i>Pseudomonas</i>	8	89	12	71	11	73	7	41
Enterobacteriaceae	-	-	20	19.6	-	-	35	29.9
Flavobacteriaceae	5	17.9	8	7.8	2	2.7	12	10.3
Comamonadaceae	2	7.1	3	2.9	4	5.5	3	2.6
Microbacteriaceae	1	3.6	2	2.0	13	17.8	4	3.4
Rhizobiaceae	-	-	15	14.7	12	16.4	13	11.1
Xanthomonadaceae	-	-	4	3.9	5	6.8	3	2.6
Micrococcaceae	3	10.7	-	-	-	-	3	2.6
Sphingobacteriaceae	1	3.6	1	1.0	3	4.1	1	0.9
Sphingomonadaceae	-	-	-	-	6	8.2	1	0.9
Norcardiaceae	-	-	3	2.9	2	2.7	-	-
Bacillaceae	-	-	1	1.0	-	-	1	0.9
Caulobacteraceae	1	3.6	1	1.0	1	1.4	-	-
Promicromonosporaceae	-	-	-	-	-	-	1	0.9
Moraxellaceae	-	-	-	-	1	1.4	-	-
Antal identifierade isolat	22	78.6	75	73.5	64	87.7	94	80.3
Antal oidentifierade isolat	6	21.4	27	26.5	9	12.3	23	19.7
Summa isolat	28		102		73		117	320

Vi vill dock poängtera att de erhållna resultaten bör verifieras med nya studier för att kunna dra säkra slutsatser. Dessutom bör resultaten erhållna från odlingsbar ansats tolkas försiktigt eftersom kompletterande analyser med icke-odlingsbar ansats baserad på in-depth sekvensering och flera sorter med jämförbar grobarhet behövs för att få en fullständig bild av bakterier i åkerbönans knölar.

Vår studie med odlingsbar ansats visar att tillsatts av socker har en inverkan på samhällsstrukturen hos bakterier i rotknölar på tidiga utvecklingsstadiet av åkerböna. Betydelsen av tillförsel av socker på bakteriesamhällens sammansättning i kväveknölar och på kvävefixering under hela odlings-säsongen behöver studeras med mikrobiella analyser av prover tagna vid flera tillfällen.

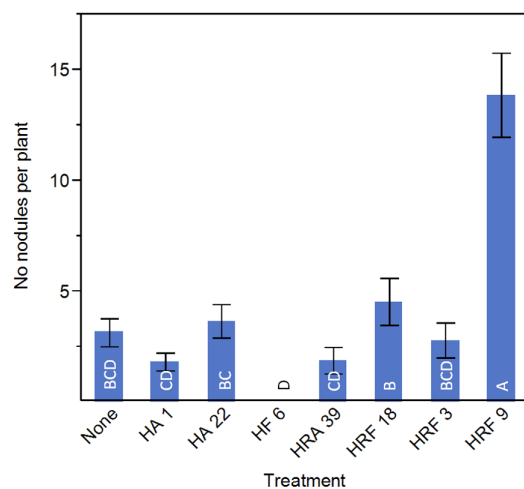
Vilken inverkan PGPB stammar tillhörande *Serratia* och *Pseudomonas* har på bakteriesamhällstruktur i allmänhet och rhizobier i synnerhet i fältmiljö, och om detta är nyttigt för kvävefixering i knölar är några av flera obesvarade frågor för framtida studier. Nykunskap erhållen i vår studie om bakterier som *Rhizobium* måste konkurrera med för att lyckats med knölbildning och kvävefixering är mycket värdefull för vårt fortsatta arbete med att förbättra förutsättningar för etablering, kolonisering och effektivitet av rhizobier i fält.

Biotester med nysolerade knölbakterier i växthus

I initialt skede var våra undersökningar med *Rhizobium* begränsade till tre stammar, ÅB4, ÅB17 och *R. leguminosarum* 314-2. Om ÅB4 och ÅB17 verkligen är *Rhizobium*-arter har inte kunnat klarläggas trots upprepade försök med molekylär identifiering och odlingstester på specifika näringsmedier. I syfte att hitta rhizobier som lämpar sig bättre för just åkerböna valde vi att testa nysolerade rhizobiastammar. Av 40 rhizobier ovan valdes 11 till synes olika stammar för biotester avseende deras förmåga att förbättra planttillväxt och knölbildning i växthusförsök med sorten Fuego. Utöver rhizobier ingick även 46 nysolerade icke-rhizobier i studien. Sju av samtliga 57 testade isolat visade positiv effekt på både uppkomst och planttillväxt (en sådan framgång av Bild 2). Inga nya rhizobier gav mätbar positiv effekt på Fuego. I nästa steg utfördes nya biotester med de 7 bakteriestamma på äkerbönssorten Tattoo. Både Fuego och Tattoo odlas kommersiellt.



Bild 2. Effekt av inokulering med en knölbakterie i Fuego. Kontroll till vänster.



Figur 6. Antal knölar på Tattoo plantrötter efter behandling med sju olika knölbakterier jämfört med kontroller. N=4 (6 frö/kruka). P-value <0.0001. Strecken representerar medelfelet. Staplar med olika bokstäver är signifikant åtskilda (Student's t, p<0.05).

Bakterien, HRF9 tillhörande *Flavobacterium* sp. utmärkte sig bäst i båda screeningstester avseende stimulering av planttillväxt och antal friska knölar jämfört med i kontrollplantor (Figur 6, Hnin, 2014). En möjlig förklaring till skillnader i olika bakteriernas respons i reaktion till sorter kan vara skillnad i utsädekvallitet och därmed sammansättningen av dess naturlig förekommande fröburen mikroflora, men även olika kemisksammansättning av deras fröexudat.

Undersökningar i fält - År 2014

För att belysa effekter av rhizobier och antagonistiska bakterier i fältmiljö genomfördes fältförsök under 2014 i Östergötland respektive Västergötland. Fältet i Östergötland hade en lerhaltig jord (pH 6.6, mullhalt 4.8 %, lerhalt 34 %, silt 51.5 % och sand 9.7%) medan fältet i Västergötland hade en mer sandig jord men samma pH (pH 6.7, mullhalt 2.6%, ler 18 %, silt 54 % och sand 25.4 %). I försöken jämfördes effekter av singel- respektive blandinokulering med och utan tillsats av socker. Syftet med försöken var för att utvärdera behandlingarnas inverkan, kvalitativt och kvantitativt, på fröskörden. Rhizobiestammarna ÅB4 och *R. leguminosarum* 314-2 samt PGPB bakterierna *S. proteamaculans* S4, *P. fluorescens* ARLS510, togs med i fältförsöket med anledning av deras effekter i tidigare studier och att de var kompatibla med varandra och med åkerbönrötter. (Akhter 2014). Ytterligare en bakterie (HRF3) ingick i fältstudien på grund av dess positiva effekter i biotester i växthus med sorten Tattoo.

Tattoo (grobarhet 85%) var en av två sorterna tillsammans med Taifun (grobarhet 77%) som användes i fältförsöket. Båda sorterna hade inte någon känd smitta. Fröna behandlades med bakteriestammarna enligt specifikationer i Tabell 2. Bakterierna tillfördes enskilt eller som blandymp med och utan tillsats. I kontrollet användes obehandlat utsäde.

Tabell 2. Fjorton olika behandlingar av utsädet samt ett kontroller som ingick i fältförsök 2014 år med två sorters åkerböna med och utan tillsats i Östergötland (Tegneby) respektive Västergötland (Grästorpe). N=4

	Sort Taifun	Sort Tattoo	Behandlingar
1	A1	B1	Obehandlad
2	A2	B2	Manitol (tillsats)
3	A3	B3	S4+ Manitol
4	A4	B4	ARLS510+ Manitol
5	A5	B5	ÅB4+ Manitol
6	A6	B6	<i>R. leguminosarum</i> + Manitol
7	A7	B7	ÅB4 + <i>R.leguminosarum</i> + Manitol
8	A8	B8	S4+ ÅB4+ Manitol
9	A9	B9	S4+ <i>R.leguminosarum</i> + Manitol
10	A10	B10	ARLS510+ ÅB4+ Manitol
11	A11	B11	ARLS510+ <i>R.leguminosarum</i> + Manitol
12	A12	B12	HRF3 + Manitol
13	A13	B13	HRF3+ ÅB4+ Manitol
14	A14	B14	HRF3+ <i>R.leguminosarum</i>
15	A15	B15	Sucrose (tillsats)

Fröna betades med metoder framtagna i vårt laboratorium. Antal bakterier tillförda per behandlat frö bestämdes genom att skaka betade frön i en fosfatbufferlösning (5 frö i 10ml, n=2), följt av spädningsserier på varje suspension och spridning på ett lämpligt odlingssubstrat.

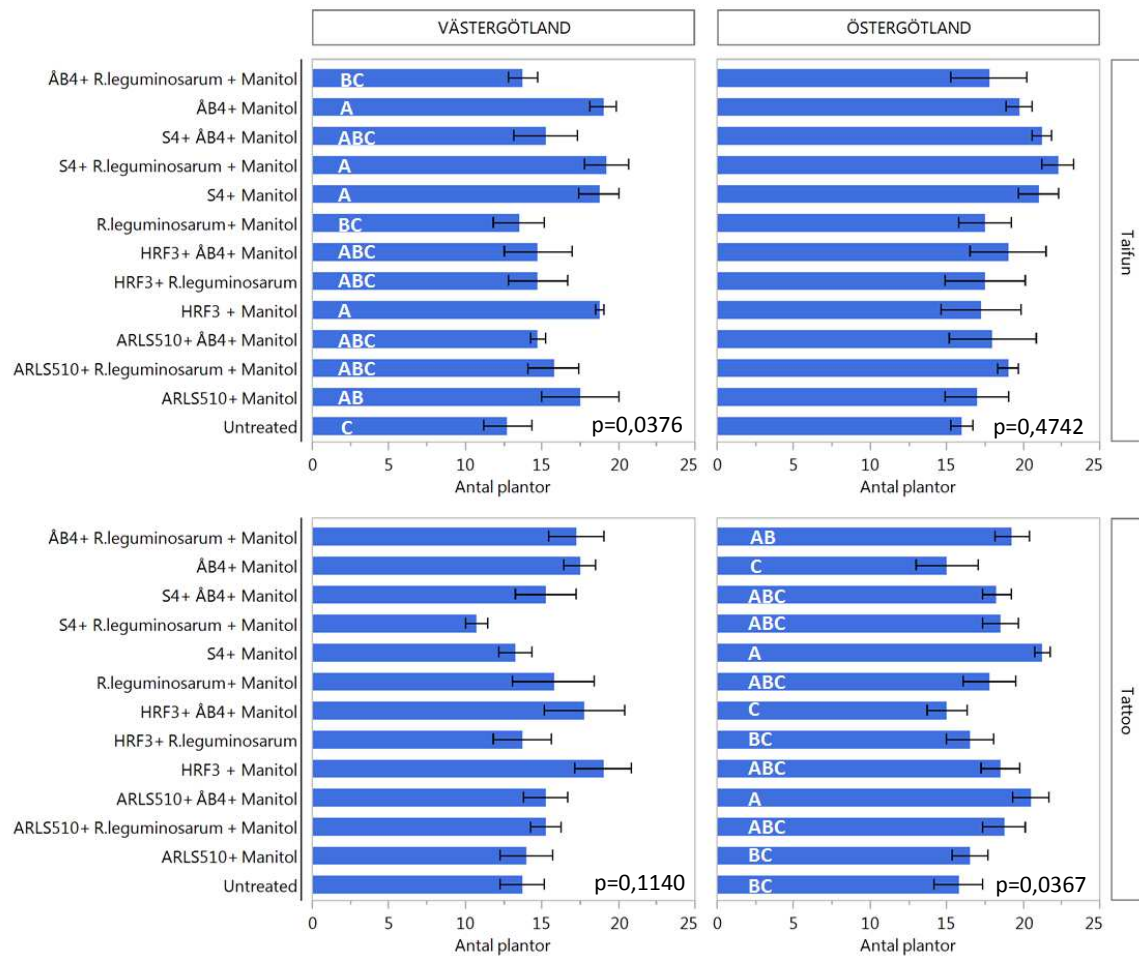
Försöket anlades som ett fullständigt randomiserat blockförsök med fyra upprepningar. Parcellstorleken var 20 kvm (skördeyta 15 – 17 kvm). Uppkomsten noterades och plantprover samlades in vid två tillfällen. Tio plantor med hela rotsystemet per parcell (=40 plantor/ behandling/sort/försök) grävdes upp för avläsningar av bland annat kväveknölar på rötterna och graden av rotinfektion. Rotknölbildning avlästes genom att räkna plantor i fyra klasser (KLASS 1= inga knölar, KLASS 2= bara små, 1 till 10, knölar på hela rotsystemet, KLASS 3= de flesta små, 11 till 25, knölar på hela rotsystemet, KLASS 4=stora, 3 till 15, knölar på hela rotsystemet). Detta avläsningsförfarande användes enbart för de tidiga plantproverna.

Svampgradering/grödans vigör, planträkning och stråstyrka registrerades under odlingssäsongen och fröskörden uppmättes i slutet på säsongen. Skördeproverna (500g/parcell) från båda fältförsök lagrades mörkt i rumstemperatur för fortsatta sundhetsanalyser under våren 2015.

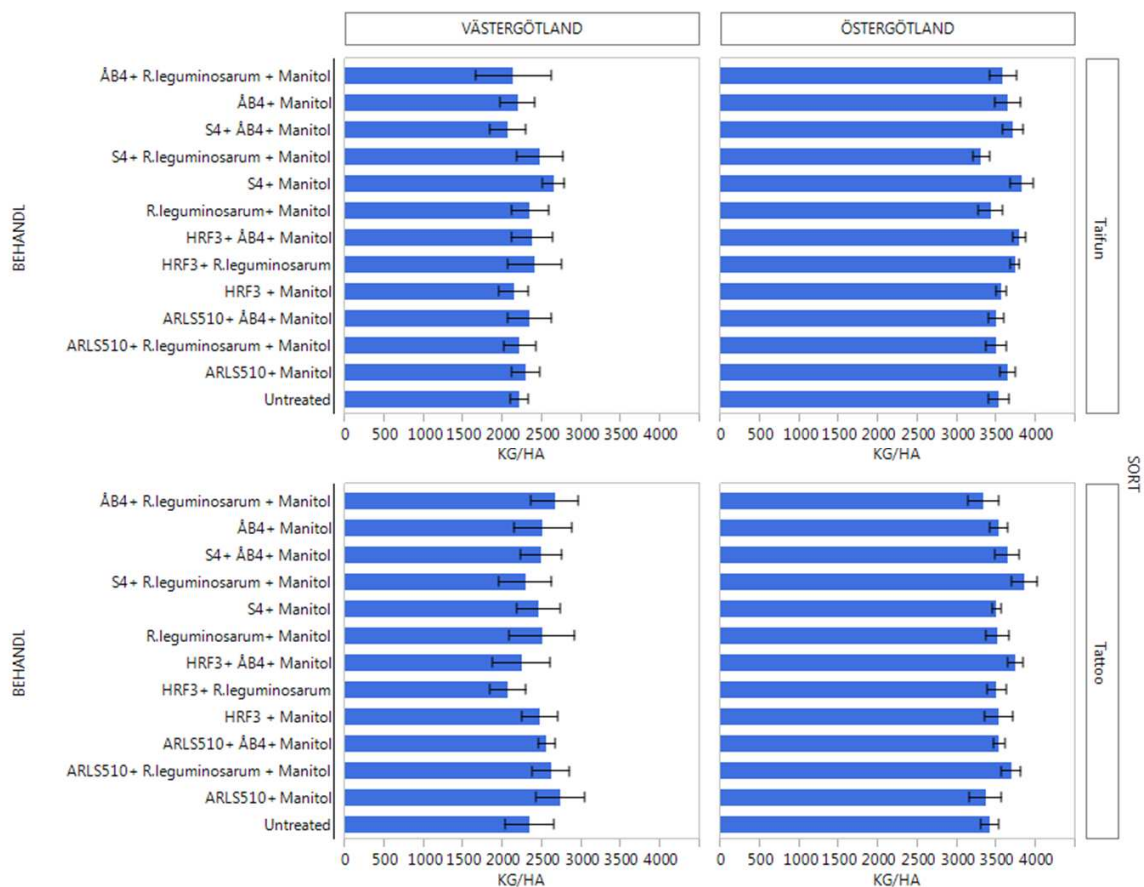
Analysen pågår och endast delresultat presenteras här i rapporten.

Generellt sett fanns det stora skillnader mellan försöksfälten i Östergötland och Västergötland avseende både uppkomst och skördenivå. Ogräs som tussilago, trädgårdsmålla och kvickrot samt angrepp av bladlöss och klumprotsjuka var fläckvis riklig förekommande i fältförsöket i Västergötland. Detta återspeglades i skörden då den var ca en ton/ha högre fröskörd i Östergötland än i Västergötland. (Figur 8). Kväveknölbildning förekom tidigare i sorterna odlad i försöksfält i Östergötland än i Västergötland (data ej visat).

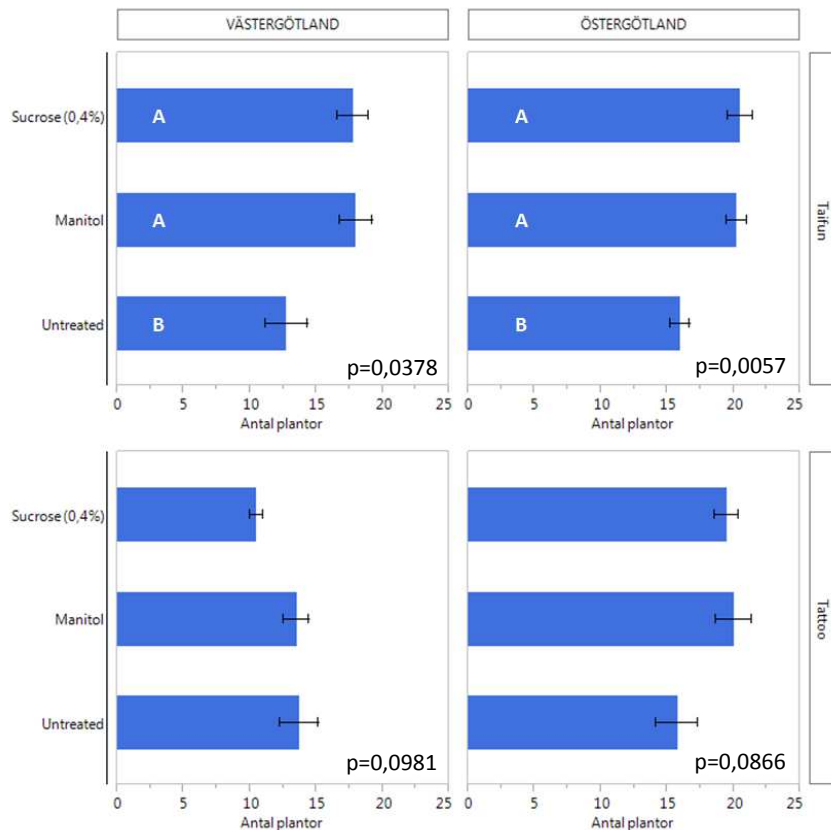
Vissa bakteriebehandlingar påvisades ha en positiv effekt på antal uppkomna plantor, och effekten var beroende på sort och försöksplats (Figur 7). En positiv inverkan av vissa bakteriebehandlingar registrerade på igångsättning av knölbildning i Tattoo i Västergötland och Taifun i Östergötland. Detta uppmättes som flera antal plantor i en högre klass än klass 1 i kontroll. (data ej visat). En skördeökning (7-23%) uppmättes i vissa behandlade led men ökningen varierade med behandling, sort och plats och den var inte statistiskt signifikant. (Figur 8). En viss positiv inverkan av tillsats av socker observerades främst på uppkomst (Figur 9) och kväveknölbildning (data ej visat), men även här var effekterna beroende på sort och plats. Sortskillnader och geografiska skillnader i behandlingseffekter har flera möjliga förklaringar vilket inkluderar ojämnt antal bakterier per frö på utsädet vid sådden (data ej visat) och deras ojämna överlevnad samt olika förmåga hos de tillförda bakterierna att potentiellt lyckas kolonisera knölarna. Detta undersöktes inte inom ramen för detta projekt.



Figur 7. Antal uppkomna plantor på 3 sträckmeter efter bakteriebetning av åkerböna i fältförsök. Strecken representerar medelfelet. Staplar med olika bokstäver är signifikant åtskilda (Student's t, $p<0.05$).



Figur 8. Skörd efter bakteriebetning av åkerböna i fältförsök. P -value < 0.0001 . Strecken representerar medelfelet. Inga signifikant skillnader kunde observeras i försöket



Figur 9. Antal uppkomna plantor på 3 sträckmeter efter tillsats av socker i åkerböna i fältförsök. Strecken representerar medelfelet. Staplar med olika bokstäver är signifikant åtskilda (Student's t, $p < 0.05$).

Slutligen, hittills erhållna resultat visar på betydelsen av behandlingar för förbättrat uppkomst, planttillväxt, plantvikt, knölbildning då utsädet har nedsatt grobarhet och är naturlig smittad. Dåligt utsäde leder till försämrar odlingssäkerheten i åkerböna.

PLANER FÖR VERKSAMHET UNDER 2015

Vårt huvudsyfte med projektet är att bidra med kunskap om utnyttjandet av symbiotiska rhizobier tillsammans med icke-symbiotiska antagonistiska rotbakterier för ökad odlingssäkerhet i åkerbönodling. Inom ramen för de fortsatta studierna år 2015 :

- Gå vidare med att analysera och avsluta studier om vitalitet och utsädesburen smitta i skördeprover från de två fältförsök som utfördes sommaren 2014.
- Isolering av patogenasvampar görs från 30 fröplantor/sort/fält med morfologisk olika sjukdomssymtom. Identiteten av förekommande svampar bestäms med PCR baserade metoder.
- Gå vidare med att bedöma hur stora förluster orsakas av de skadesvampar som vi lyckas isolera ovan och bestämma mottagligheten hos kommersiella sorter.
- Gå vidare med att studera tillförlitligheten gällande effekter av PGPB (*Serratia* spp S4) och tre nya *Rhizobium* bakterier (*Rhizobium*3126, *Rhizobium*HYA34 och *Rhizobium*HYF3) förutom ÅB4 och *R. leguminosarum* 314-2) på uppkomst, sjukdomshämning, plantutveckling i naturligt smittat utsäde i växthusförsök. Sortskillnader kommer att beaktas.
- I vilken utsträckning bästa rhizobierna i blandymp med bästa PGPB ovan påverkar åkerbönas avkastning i fält testas i nya fältförsök år 2015. Effekterna avläses avseende uppkomst,

sjukdomshämning och plantutveckling, om möjligt i två kommersiella åkerbönsorter; Aurora (landsort) och Tattoo. Utsädet med naturlig smitta om möjligt tas med i studien för att mäta behandlingarnas effekter på uppkomst och sjukdomsbekämpning. Observationer i behandlade led kommer att jämföras med de i obehandlade ledet. Plantor från varje försöksparcell kommer att analyseras bl a med hänsyn till skott torrsvikt, kväveinnehåll, fröskördens kvantitet och kvalitet (avseende grobarhet och förekomsten av utsädessmitta).

F. för att lyckas med att optimera behandlingseffekter i fält vill vi i kompletterande studier i mån av tid utröna 1) hur väl *Rhizobium*3126, *Rhizobium*HYA34 och *Rhizobium*HYF3 lyckas koloniserar åkerböna, 2) hur konkurrenskraftiga är dessa som blandymp med PGPB, 3) tillsatsens inverkan på deras effektivitet och 4) hur effektiva är rhizobierna på att hämma åkerböns skadesvampar jämfört med PGPB.

G. fortsätta och slutföra karakteriseringsarbetet av rhizobier och PGPB avseende ämnen som kan belysa deras nyttoeffekter. Denna delstudie skall säkerställa tillförlitligheten i effektivitet av rhizobiernas som ska selekteras för kombinationseffekter.

H. Sammanställa och analysera resultaten för publicering och rapportering

RESULTATSPRIDNING

Resultat erhållna hittills ska presenteras på FoU dagar i Hässleholm den 4 mars 2015.

Skrivarbetet för en publikation avsedd för en referee tidskrift har initierats.

REFERENSER

- Alström S and B Andersson 2011. Minskat svampangrepp och ökad skörd i raps med hjälp av bio-antagonister. Slutrapport till SLF, Stockholm
- 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.
- Alström S and B Andersson 2012. Biologisk kontroll av jordburna sjukdomar i potatis. Slutrapport till SJV, Norrköping
- 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)
- Neupane, S., Finlay, R.D., Kyrpides, N.C., Goodwin, L., Alström, S., et al. .2013. Non-contiguous complete genome sequence of the plant-associated *Serratia proteamaculans* S4. Stand Genomic Sci 8:441-449.
- Neupane, S., 2013. Genomics and transcriptomics of plant beneficial *Serratia* spp. Acta Universitatis agriculturae Sueciae, 1652-6880 ; 2013:44
- Narula S, R.C. Anand, SS Dudeja, Vishal and D.V. Pathak. 2013. Molecular diversity of root and nodule endophytic bacteria from field pea. Legume Research, 36 (4) : 344- 350
- Xia Lei · En Tao Wang · Wen Feng Chen · Xin Hua Sui · Wen Xin Chen (2008). Diverse bacteria isolated from root nodules of wild *Vicia* species grown in temperate region of China Arch Microbiol 190:657–671