

---

Reviderad slutrapport för forskningsprojektet:

## **SKÖRDEÖKNING OCH ODLINGSSÄKERHET I PROTEINGRÖDAN ÅKERBÖNA (*Vicia faba*) GENOM UTNYTTJANDE AV SYNERGISM MELLAN OLIKA RHIZOSFÄRBAKTERIER**

Ekhaga stiftelsens diarienummer: 2013-14

Projektansvariga: Sadhna Alström

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

Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi, SLU, Uppsala

---

### **Introduktion med syfte och hypotes**

Odlingen av åkerböna i Sverige har ökat kraftigt under senare år, främst för att tillgodose en önskan om en ökad andel inhemskt odlat proteinfoder. Åkerböna har goda effekter som avbrottsgröda i spannmålstunga växtföljder och genom sin förmåga att i symbios med kvävefixerade bakterier binda upp till 300 kg N per hektar och år. Detta är speciellt viktigt för kväveförsörjningen i ekologisk växtproduktion. Sammantaget har värdet av åkerböna som avbrottsgröda beräknats till 500-950 kg/ha i ökad avkastning av spannmål (Lindén 2008, Rodelas et al 1999). Odlingen av åkerböna har problem med svampsjukdomar. De allvarligaste är chokladfläcksjuka (*Botrytis fabae*), bönsfläcksjuka (*Ascochyta fabae*) och bönsbladsmögel (*Peronospora viciae*). (Agrios 2005, Westman 2010). Andra jordburna patogena svampar såsom *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* och *Phytophthora* förekommer också, och problemen med dessa hotar att öka om odlingen av åkerböna blir mera intensiv med kortare intervall mellan åkerbönsgrödorna i växtföljden.

Ympning av åkerbönsutsäde med N-fixerande bakterier görs bara i liten omfattning i Sverige, men det kan finnas en outnyttjad potential här. Tidigare växthusförsök med bakteriebetning av åkerböna med två kommersiella *Rhizobium*-preparat och två egenisolerade *Rhizobium*-stammar visade på förbättrad uppkomst och plantutveckling hos åkerböna. *Rhizobium* hade även förmågan att hämma angreppen av patogena svampar på åkerböna (*Botrytis*, *Ascochyta*, och *Fusarium*) i laboratorietester.

Projektet "Skördeökning och odlingssäkerhet i proteingrödan åkerböna (*Vicia faba*) genom utnyttjande av synergism mellan olika rhizosfärbakterier" som bedrevs under åren 2014 – 2016, syftade till att ta fram kunskap för att bidra till en förbättrad odlingssäkerhet i åkerböna. I projektet gjordes utsädesympning av åkerböna för att studerade effekter av enskild ympning och samympning med symbiotiska rhizobier och icke-symbiotiska antagonistiska rotbakterier med tillväxtfrämjande effekt (Plant Growth-Promoting Bacteria, PGPB). Projektets hypotes var att utsädesympning med kvävefixerade och tillväxtfrämjande bakterier ger en bättre odlingssäkerhet i åkerböna genom synergistiska effekter på grödans vitalitet.

### **Statistisk behandling av resultaten**

Alla statistiska analyser gjordes med JMP® 13.0.0. Plats- och sorteffekterna var signifikanta i många av fältförsöken, men eftersom det inte fanns några samspelseffekter för behandling redovisas alla resultat med behandling (bakteriebetning) som huvudeffekt. Student t-test ( $p=0,05$ ) användes för att jämföra medelvärden

### **Material och metoder samt resultat 2014**

#### **Växthusförsök 2014**

##### ***Kompatibilitetstudier mellan rhizobier, PGPB och åkerböna***

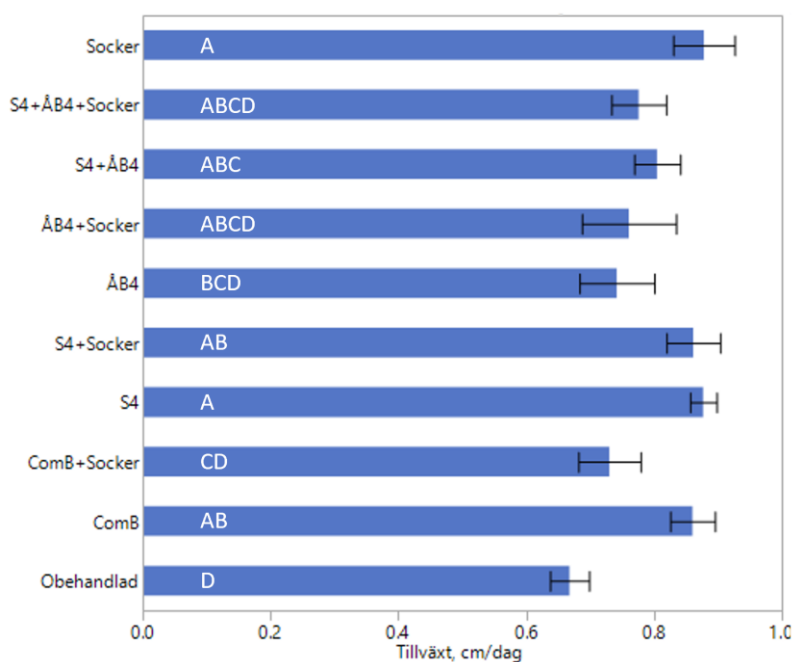
Vi studerade inledningsvis två rhizobiestammar, ÅB4 och *R. leguminosarum* 314-2 samt två stammar av PGPB-bakterier, ARLS510 (*Pseudomonas fluorescens*) och S4 (*Serratia proteomaculans*). PGPB-stammarna valdes på grund av de i tidigare *in vitro*-studier visat förmåga att kunna hämma tillväxt av bönspatogener tillhörande släktena *Ascochyta*, *Botrytis* och/eller *Fusarium* i (Akhter 2014).

För att optimera behandlingseffekter i åkerböna undersöktes om bakteriestammarna var kompatibla, dels med varandra och dels med åkerböna. För att få en bild av kompatibilitet/konkurrensförmåga hos de två bakteriegrupperna utfördes ett växthusförsök där fyra bakteriestammar tillfördes enskilt respektive som samympning

på åkerbönsfrö av två sorter, Aurora och Fuego. För att minimera störande effekter från naturligt förekommande utsädesburen ytmikroflora sköljdes fröna i rinnande kranvatten innan de olika bakterierna tillsattes. Fröna såddes i vermikulit, och efter två veckor bestämdes mängden bakterier per gram torr rotvikt i de olika bakteriebehandlingarna genom odling på specifika odlingssubstrat. Resultatet visade att både rhizobierna och PGPB koloniserade åkerböna, både då de inokulerades enskilt och i blandning. Dessutom stimulerade båda PGPB-stammarna kolonisering av *Rhizobium* (Akhter, 2014). Isolat S4 visade sig kunna kolonisera rötter hos åkerböna trots att den härstammar från åkerfräken (*Equisetum arvense*).

#### **Bakteriernas inverkan på planttillväxt, knölbildning och sjukdomsangrepp hos åkerböna.**

Utsäde av sorten Fuego behandlades med färskodlade bakterier och såddes i ett krukförsök i växthus (n=6, 2 frö/kruka). En blandning av Leca-kulor och fältjord (måttligt mullhaltig mjälåg lättlera) från ett ekologisk odlat åkerbönfält i Vara, Västra Götaland användes. I en tidigare pilotstudie med *Rhizobium* observerade vi ett ökat antal kväveknölar på åkerbönpantor när socker tillsattes tillsammans med *Rhizobium*, och behandling med socker togs därför med i studien. S4 (*Serratia*), ÅB4 (*Rhizobium*) och ett kommersiellt preparat (kallas ComB i denna studie) användes för enskild respektive samympning med och utan tillsats av socker. Sammanlagt 10 olika behandlingar per sort ingick i försöket. ComB tillfördes enligt tillverkarens rekommendationer, vilket innebär att cellhalten inte var samma som i leden med bakteriebehandlingar. Uppkomst, skottlängd, antal sjuka plantor registrerades under två månader och därefter bestämdes antal rotknölar, knölvikt och plantvikt i samtliga led. Angrepp på rötter bedömdes enligt en 5-gradig skala där 0 är helt frisk rot och 5 är en kraftigt missfärgad rot.

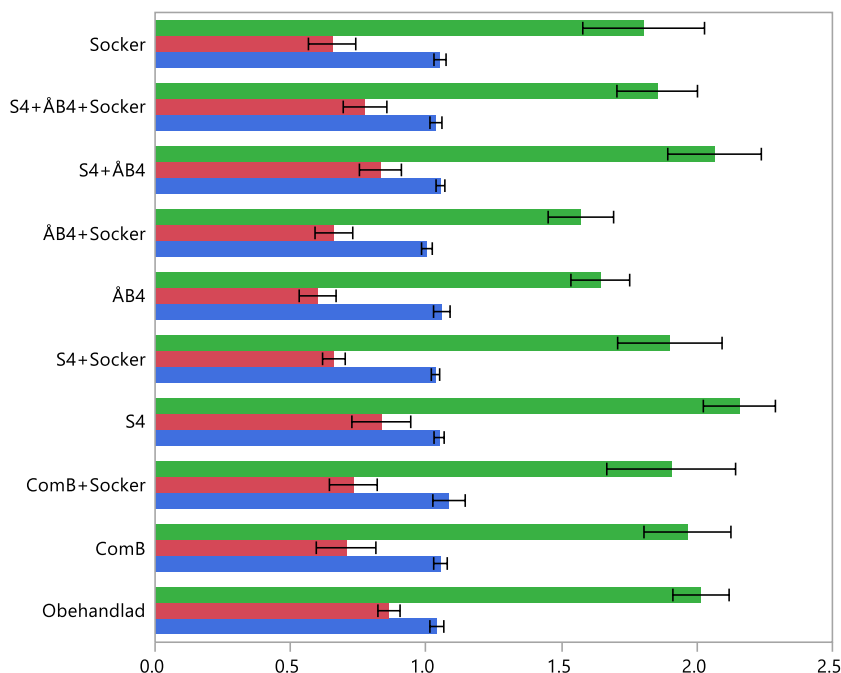


**Figur 1.** Inverkan på tillväxthastighet hos åkerböna (cv. Fuego) av fröympning med ÅB4 (rhizobiebakterie), S4 (PGPB) och ComB (kommersiellt preparat) med respektive utan tillsats av socker.

Strecken representerar medelvärdet. Staplar med olika bokstäver är signifikant åtskilda, Student's t,  $p < 0.05$ .

Planttillväxten var signifikant snabbare än kontrollen (Figur 1) i de flesta bakterie-behandlade leden. Den positiva effekten av ComB kan inte förklaras med bakterieeffekt eftersom varken *Rhizobium* spp. eller någon annan mikroorganism hittades i preparatet trots upprepade försök. Tillsats av socker tillsammans med bakteriestammarna gav en oförändrad eller minskad tillväxt. Socker tillsatt utan bakterier gav en signifikant snabbare tillväxt jämfört med kontrollen.

Inga signifikanta skillnader mellan effekterna av de olika behandlingarna på torrsvikt av rötter, skottsvikt eller färsksvikt av kväveknölar ( $p = 0,2727 - 0,8395$ ), se figur 2.

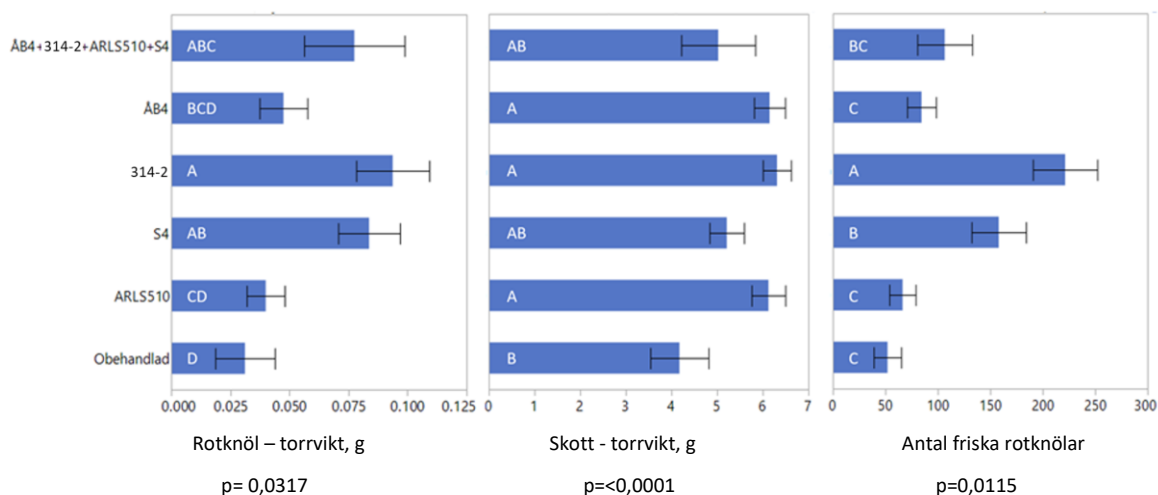


**Figur 2.** Inverkan av fröympning med ÅB4 (rhizobiebakterie), S4 (PGPB) och ComB (kommersiellt preparat) med respektive utan tillsats av socker på skottsvikt, rotvikt samt färsk knölvikt hos åkerböna (cv. Fuego).

Strecken representerar medelfelet. Inga signifikanta skillnader mellan de olika behandlingarna kunde observeras i försöken.

Färsksvikt rotnölar, g  
Torrsvikt rot, g  
Torrsvikt skott, g

I ett andra växthusförsök användes sorten Columbo med naturlig fröburen smitta av *Ascochyta* sp. (17 % infekterade frön). Fröna behandlades med stammarna ÅB4 och 314-2 (båda rhizobiebakterier), samt ARLS510 och S4 (PGPB) enskilda eller i blandning. De behandlade fröna såddes (2 frö/kruka, och  $n=8$ ) i en blandning Leca-kulor och  $\gamma$ -steriliserad fältjord (mellanlera) från Ultuna. Försöket pågick i tio veckor och behandlingarnas effekter på uppkomst, torr plantvikt, rotinfektion, antal friska knölar och torr knölvikt registrerades. Ympning med rhizobierna ÅB4 respektive 314-2 (*R. leguminosarum*) gav en signifikant förbättrad planttillväxt jämfört med kontrollen. Behandling med 314-2 gav flest rotnölar, men även S4 (*Serratia proteamaculans*) stimulerade knölbildning jämfört med kontrollen (figur 3).

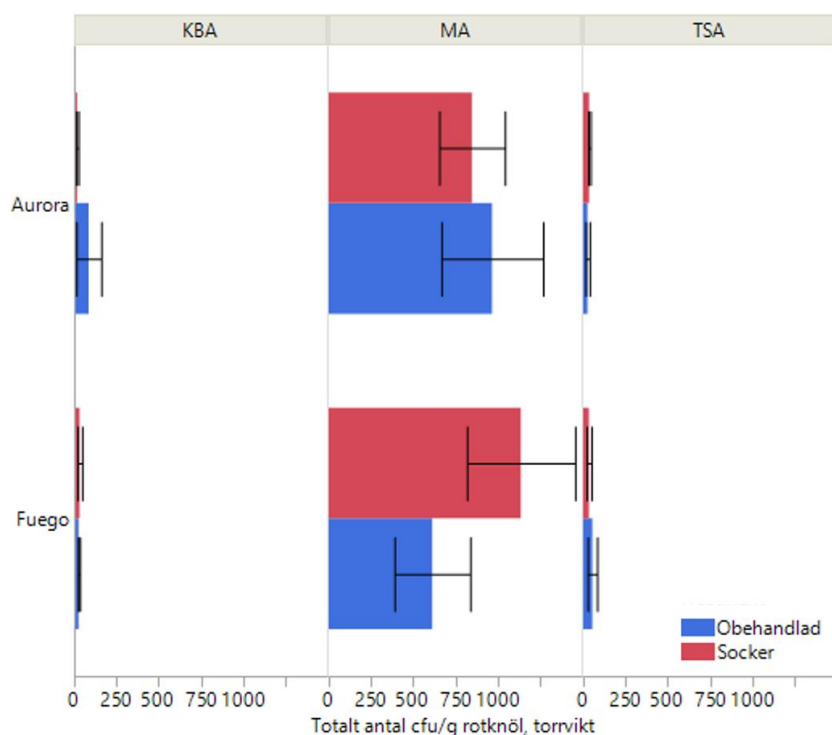


**Figur 3.** Inverkan av två rhizobiestammar (ÅB4 och 314-2) och två PGPB-stammar (S4 och ARLS 510) på skottsvikt, antal friska knölar och torrsvikt av rotnölar på åkerböna (sort Columbo, utsädesmitta 17% *Ascochyta*) efter behandling med en bakteriestam respektive blandning av de olika stammarna.  $n=8$ , 2 frö/kruka. Strecken representerar medelfelet. Staplar med olika bokstäver är signifikant åtskilda (Student's t,  $p<0.05$ ).

### Inverkan av socker på bakteriesamhällen i åkerbönans kväveknölar

Studier av vilda *Vicia* spp och andra leguminosor har visat att kvävefixerande rotknölar även innehåller icke-rhizobier (Lei et al 2008, Narula et al 2012). För att bättre förstå effekterna av tillsats av socker vid utsädesympning bestämdes andelen *Rhizobium* i bakteriesamhället i rotknölar från sockerbehandlade respektive obehandlade plantor av åkerböna. Syftet med denna studie var att ta reda på om en tillsats av socker påverkade andelen rhizobier i rotknölar, samt vilka andra bakterier som koloniserar åkerbönans kväveknölar. Endast odlingsbara bakterier, som t. ex. *Rhizobium* spp, undersöktes i denna studie, och bakteriesamhällena i kväveknölar analyserades genom odling på 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 på tre agarmedier, manitol (MA), Kings medium B (KBA) och tryptic soy (TSA). Dessa medier är alla lämpliga odling av bakterier men är delvis specifika. MA innehåller manitol och gynnar tillväxt av *Rhizobium* spp medan KBA-agar innehåller proteos, pepton och glycerol, som gynnar tillväxten av fluorescerande *Pseudomonas*-arter.

Figur 4 visar betydelsen av valet av odlingssubstrat vid kvantifiering av bakterier i rotknölar, och i stort sett skedde tillväxt av bakterier enbart på maltagar. Mängden bakterier per gram knölvävnad var inte signifikant skillnad vare sig mellan sort eller mellan behandling.



**Figur 4.** Mängd bakterier (cfu/g knölvikt) i kväveknölar från socker-behandlade Aurora och Fuego plantor jämfört med i kontrollplantor på tre olika odlingssubstrat; KBA (Kings medium agar), MA (Manitol agar) och TSA (Tryptic soy agar).

Strecken anger medelfelet. Inga signifikanta skillnader mellan de olika behandlingarna kunde observeras i försöken.

Totalt erhöles 320 olika bakterieisolat från kväveknölar, varav 255 isolat kunde identifieras med hjälp av molekylära metoder. Tabell 1 visar fördelning av samtliga 320 isolat på sort och behandling. Rotknölar visade generellt en hög bakteriediversitet och innehöll bakterier från totalt 15 olika familjer. Av de 255 identifierade isolaten tillhörde dock endast 40 Rhizobiaceae, trots bra tillväxt på maltagar. Tolv rhizobier isolerades från kontrollplantor av Fuego, medan inga rhizobier hittades på sorten Aurora.

Inverkan av tillsats av socker på bakteriesamhällstrukturen kunde främst ses i Aurora där antalet familjer ökade från 8 till 12 efter sockerbehandling. Bakteriestammar tillhörande Pseudomonadaceae och Enterobacteriaceae t.ex. *Serratia* spp. och fluorescerande *Pseudomonas* spp. är kända för sin positiva inverkan på växtens tillväxt och för sina effekter mot flera växtpatogener (Alström och Andersson 2011, 2012). Pseudomonadaceae dominerade i båda åkerbönsorterna, och de flesta isolaten av denna familj identifierades som fluorescerande *Pseudomonas* spp. Andelen Pseudomonadaceae var lägre i sockerbehandlade plantor än på kontrollplantorna. Inga bakterier tillhörande familjen Enterobacteriaceae i knölar från kontrollplantorna, men andelen ökade dock kraftigt till följd av sockerbehandlingen.

**Tabell 1.** Fördelningen av bakteriefamiljer inom totalt 320 bakteriestammar isolerade från åkerbönssorterna Aurora och Fuego med respektive utan sockerbehandling

Bakteriefamilj	Aurora		Fuego	
	Kontroll	+socker	Kontroll	+socker
Pseudomonadaceae	9	17	15	17
Fluorocerae <i>Pseudomonas</i>	8	12	11	7
Enterobacteriaceae	-	20	-	35
Flavobacteriaceae	5	8	2	12
Comamonadaceae	2	3	4	3
Microbacteriaceae	1	2	13	4
Rhizobiaceae	-	15	12	13
Xanthomonadaceae	-	4	5	3
Micrococcaceae	3	-	-	3
Sphingobacteriaceae	1	1	3	1
Sphingomonadaceae	-	-	6	1
Norcardiaceae	-	3	2	-
Bacillaceae	-	1	-	1
Caulobacteraceae	1	1	1	-
Promicromonosporaceae	-	-	-	1
Moraxellaceae	-	-	1	-
Antal identifierade isolat	22	75	64	94
Antal oidentifierade isolat	6	27	9	23
Summa isolat	28	102	73	117

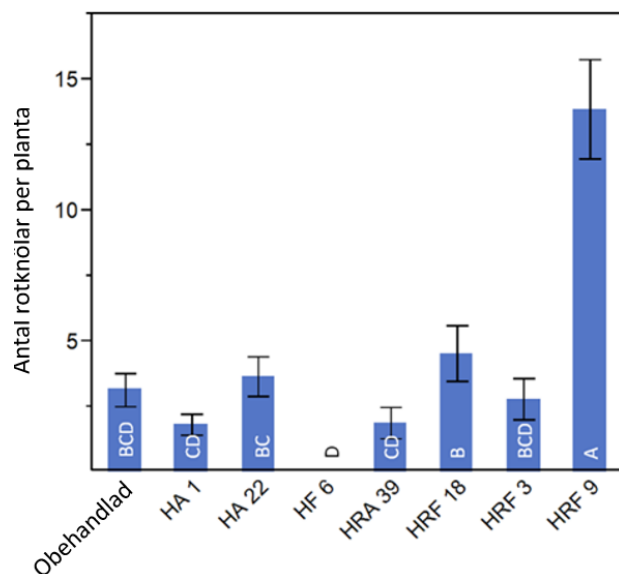
#### **Biotester med nyisolerade knölbakterier**

Under inledningen projektet använde vi tre olika *Rhizobium*-stammar; ÅB4, ÅB17 och 314-2. För att hitta rhizobier som var bättre lämpade för just åkerböna valde vi att testa nya rhizobiestammar som vi isolerat under projektet (se under "Inverkan av socker på bakteriesamhällen i åkerbönans kväveknölar" här ovan).

Från 40 nyisolerade rhizobier valdes 11 morfologiskt skilda stammar ut för bestämning av deras effekt på planttillväxt och knölbildning i växthusförsök. Utöver rhizobier ingick även 46 nyisolerade icke-rhizobier i studien. Sju av samtliga 57 testade isolat visade positiv effekt på både uppkomst och planttillväxt (se bild 1), men inga av de nyisolerade rhizobierna gav någon positiv effekt.



**Bild 1.** Effekt av inokulering med en knölbakterie i Fuego. Kontroll till vänster.



**Figur 5.** Antal knölar på Tattoo plantrötter efter behandling med sju olika knölbakterier jämfört med kontroller. N=4 (6 frö/kruka).

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

Nya biotester genomfördes med de sju bakteriestammarna som visat positiva effekter. Bakterien HRF9 (*Flavobacterium* sp.) gav stimulering av planttillväxt och antal friska knölar (Figur 5) Hnin, 2014.

#### Fältförsök år 2014

##### Utsädesbehandling

De olika bakterierna odlades upp på artificiellt media för att få från suspensioner med hög cellkoncentration. Fröna tillfördes de olika suspensionerna tillsammans med talk och gummi arabicum för att få en bra vidhäftning, se bild 2 och 3. Antal bakterier tillförda per behandlat frö bestämdes genom att skaka ett känt antal betade frön i en fosfatbufferlösning, följt av spädningsserier på varje suspension och spridning på ett lämpligt odlingssubstrat.



**Bild 2.** Obehandlat åkerbönsfrö



**Bild 3.** Bakteriebehandlat åkerbönsfrö

##### Fältförsöksbeskrivning

Rhizobiestammarna ÅB4 och *R. leguminosarum* 314-2 samt PGPB bakterierna *S. proteamaculans* S4, *P. fluorescens* ARLS510 (Akhter, 2014), samt HRF3 togs med i fältförsöket baserat på resultat från laboratorie- och växthusstudier. I försöken ingick led med singel- respektive blandinokulering, alla med tillsats av socker (manitol), se tabell 2. I kontrollet användes obehandlat utsäde.

Försöken lades ut i Östergötland och Västergötland som fullständigt randomiserade blockförsök med fyra upprepningar. Parcellstorleken var 20 kvm (skördeyta 15 – 17 kvm). 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 (pH 6.7, mullhalt 2.6%, ler 18 %, silt 54 % och sand 25.4 %). I försöket användes sorterna Tattoo (grobarhet 85%) och Taifun (grobarhet 77%). Ingen av sorterna hade inte någon känd fröburen smitta.

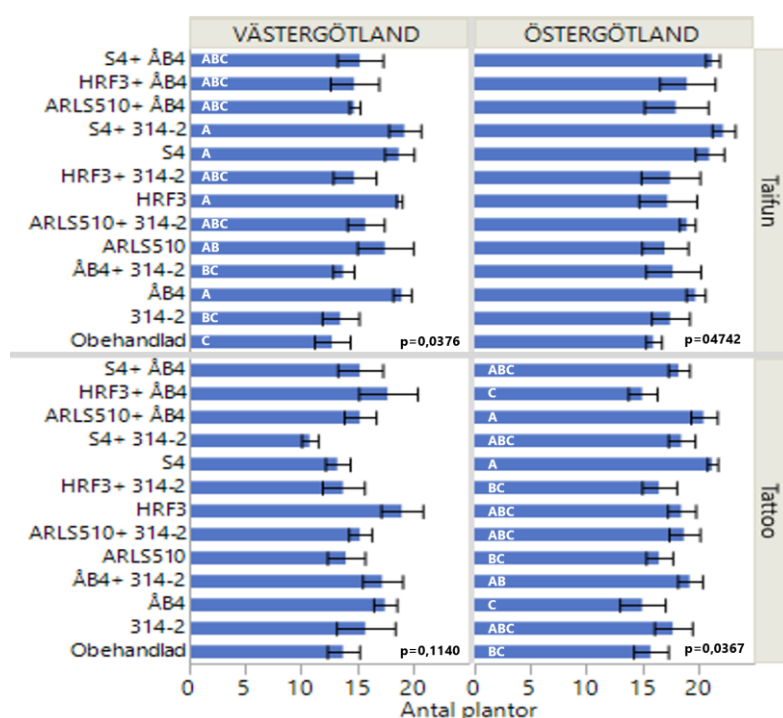
Under säsongen gjordes parcellvis planträkning och provtagning. Antal plantor räknades i tre meter i en rad på fyra ställen i varje parcell, och prover togs genom att tio plantor med hela rotsystemet per parcell grävdes upp.

**Tabell 2.** Utsädesbehandlingar i fältförsöken år 2014.

Behandling
1. Kontroll
2. 314-2 + Manitol
3. ÅB4+ Manitol
4. ÅB4 + 314-2 + Manitol
5. ARLS510+ Manitol
6. ARLS510+ 314-2 + Manitol
7. HRF3 + Manitol
8. HRF3+ 314-2 + Manitol
9. S4+ Manitol
10. S4+ 314-2 + Manitol
11. ARLS510+ ÅB4+ Manitol
12. HRF3+ ÅB4+ Manitol
13. S4+ ÅB4+ Manitol

#### Effekter av behandlingarna på uppkomst av åkerböna

Uppkomsten var bättre i båda sorterna i försöket i Östergötland ( $p < 0,0001$ ). Skillnaderna i effekt av bakteriebetningen varierade mera i försöket i Västergötland, men över lag var skillnaderna mellan de olika leden små. Signifikanta skillnader i betningseffekt konstaterades i båda försöken, men i olika sorter, se figur 6. Samympning med *Rhizobium* (314-2) gav ingen ökad positiv effekt.



**Figur 6.** Antal uppkomna plantor på tre sträckmeter vid olika bakteriebetning av åkerböna i fältförsök genomförda under 2014 i Östergötland och Västergötland i sorterna Taifun och Tattoo. Samtliga utsädesbehandlingar med de olika bakterierna skedde med en tillsats av socker (manitol).

Strecken representerar medelvärdet. Staplar med olika bokstäver är signifikant åtskilda inom plats och sort (Student's t,  $p < 0,05$ ).

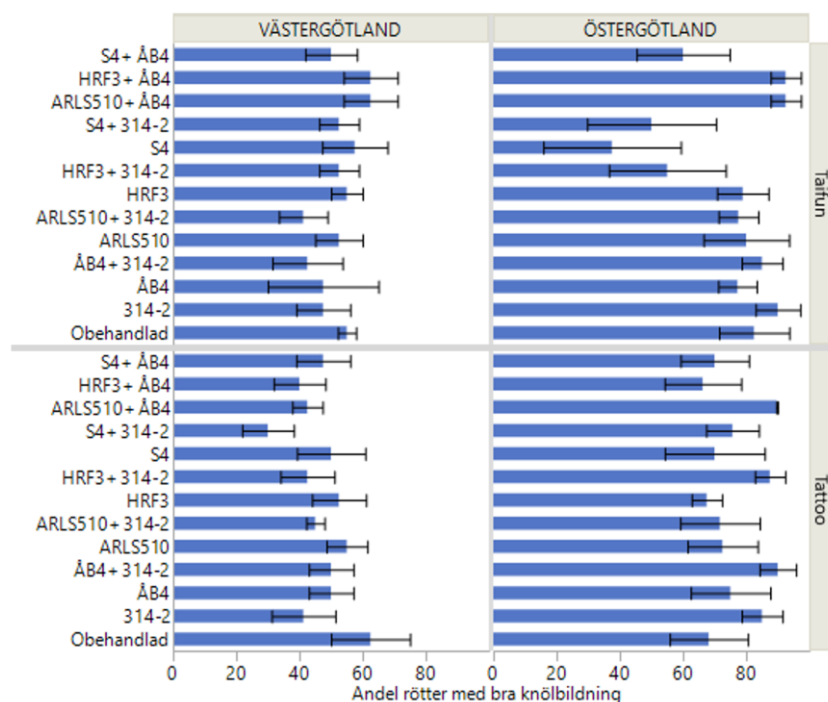
#### Effekter av behandlingarna på rotnölbildning

Gradering av tidig rotnölbildning (antal och storlek) gjordes på plantproverna insamlade två månader efter sådd. Tio plantor med rötter samlades in från alla försöksrutor i de två försöken i Östergötland respektive Västergötland. Efter insamling förvarades 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. Andel plantor som visade god knölbildning beräknades genom att addera antalet plantor i klass 3 och 4 och dividera summan med totala antalet plantor, se figur 7.

Inga signifikanta skillnader mellan de olika bakteriebetningarna kunde konstateras i försöken ( $p=0,0584 - 0,8754$ ). Rotknölbildningen skilde dock signifikant mellan de olika försöksplatserna ( $p<0,0001$ ) med en i genomsnitt bättre knölbildning i försöket i Östergötland. Samympning gav inte någon effekt på rotknölbildningen.



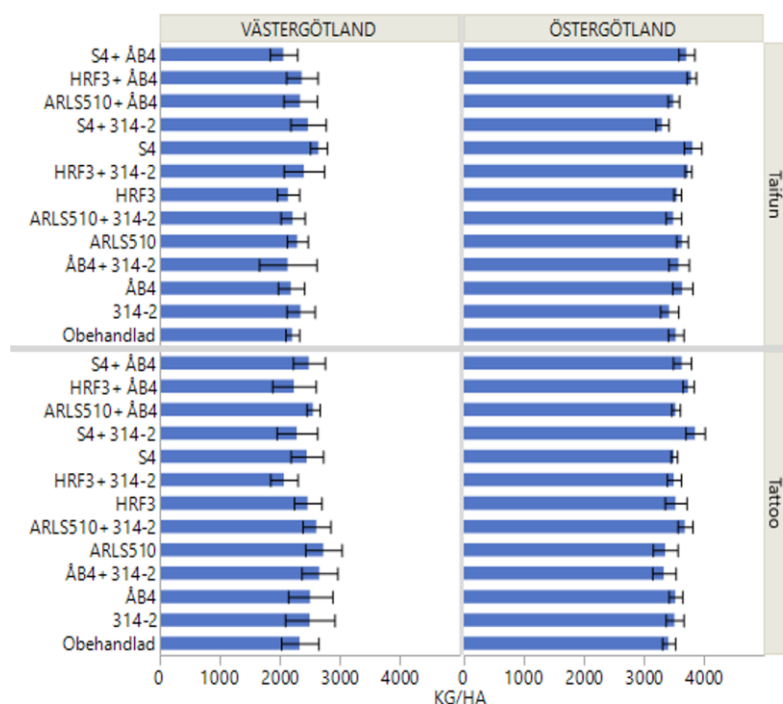
**Figur 7.** Andel plantor med god knölbildning vid olika bakteriebetning av åkerböna i fältförsök genomförda under 2014 i Östergötland och Västergötland i sorterna Taifun och Tattoo. Samtliga utsädesbehandlingar med de olika bakterierna skedde med en tillsats av socker (manitol).

Strecken representerar medelfelet. Inga signifikanta skillnader mellan de olika behandlingarna kunde observeras i försöken.

#### Effekter av behandlingarna på skördenivån

Inte heller i skördenivå kunde några signifikanta skillnader mellan de olika bakteriebehandlingarna konstateras inom försöksplats och sort ( $p=0,1821 - 0,9641$ ), se figur 8. Skörden var ca 1 000 kg högre i båda sorterna försöket i Östergötland ( $p<0,0001$ ). Det fanns även en svag, men signifikant, positiv korrelation mellan rotknölbildning och skörd i sorten Tattoo i Västergötland ( $R^2=0,16$ ,  $p=0,0013$ ).





**Figur 8.** Skörd efter bakteriebehandling av åkerböna i fältförsök genomförda under 2014 i Östergötland och Västergötland i sorterna Taifun och Tattoo. Samtliga utsädesbehandlingar med de olika bakterierna skedde med en tillsats av socker (manitol).

Strecken representerar medelfelet. Inga signifikanta skillnader mellan de olika behandlingarna kunde observeras i försöken.

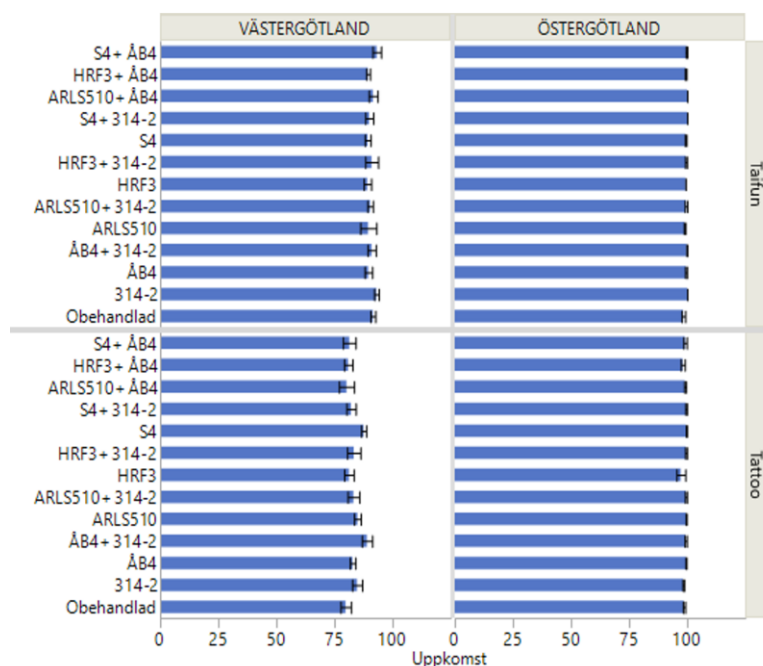
## Material och metoder samt resultat år 2015

### Sundhetstest av skörden från 2014 års fältförsök

För att undersöka smittograden i skörden från de två fältförsöken 2014 såddes trettio frö per skördeprov från samtliga behandlingar i växthus (4 upprepningar). Andel uppkomna plantor och andel plantor med sjukdomssymtom bestämdes.

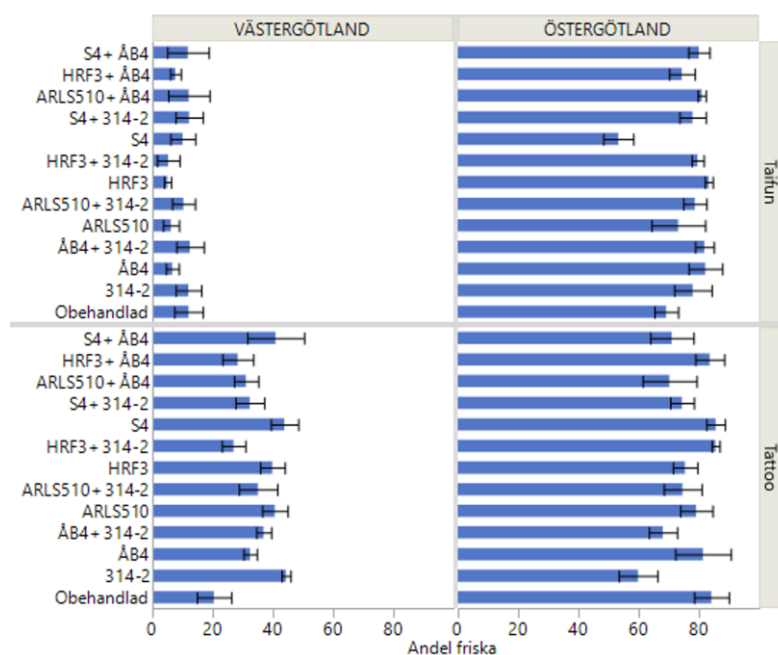
Det fanns en skillnad mellan skördeproverna från de två försöksplaterna ( $p < 0,0001$ ) respektive sorterna ( $p < 0,0001$ ) vad det gäller uppkomst (figur 9). Uppkomsten var nära 100% i skördeproverna från Östergötland, medan skörden från försöket i Västergötland gav en uppkomst på i medeltal 90% för Taifun och 83% för Tattoo.

Figur 10 visar sjukdomsförekomst graderad som mörkfärgade rötter. En mycket stor skillnad mellan skördeproverna från de två försöksplatserna ( $p < 0,0001$ ) och sorterna ( $p = 0,0001$ ) konstaterades. Andelen plantor med mörkfärgade rötter var 9,5% i Taifun respektive 34,8% i Tattoo i skördeproverna från Västergötland. Motsvarande siffror för Östergötland var 76,3% respektive 76,4%.



**Figur 9.** Uppkomst vid sundhetstest i växthus av skörden från bakteriebetade led från fältförsök genomförda under 2014 i Östergötland och Västergötland i sorterna Taifun och Tattoo.

Strecken representerar medel-felet. Inga signifikanta skillnader mellan de olika behandlingarna kunde observeras i försöken.



**Figur 10.** Andel friska plantor vid sundhetstest i växthus av skörden från bakteriebetade led från fältförsök genomförda under 2014 i Östergötland och Västergötland i sorterna Taifun och Tattoo.

Strecken representerar medel-felet. Inga signifikanta skillnader mellan de olika behandlingarna kunde observeras i försöken.

### Isolering svampisolat från skördeprover och patogenicitetstest

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 hindrar tillväxten av snabbväxande ytkontaminanter och gynnar därmed isolering av endofytiska, utsädesburna svampar. Specifika primrar användes för att identifiera de isolerade svamparna (White et al., 1990, Gardes and Bruns, 1993). De erhållna nukleotidsekvenserna jämfördes med sekvenser i NCBI GenBank (Altschul et al., 1997). Samtliga patogena svampisolat från de färsk plantproverna och de flesta från de frysta proverna identifierades som *Fusarium avenaceum*. Att så stor andel identifierades som *Fusarium* är anmärkningsvärt, eftersom isolaten skiljde sig morfologiskt, samt visade olika patogenicitet på åkerböna i biotestet (se tabell 4). Detta kan vara

relaterat till selektion vid renodlingen, men bland isolaten från de frysta proverna identifierades även andra svampar tillhörande släktena *Alternaria*, *Ascochyta*, *Ceratocystis* och *Stemphylium*. Dessa svampsläkten är välkända växtpatogener på många av våra kulturväxter.

Sammanlagt erhöles 294 svampisolat som kunde indelas i 62 morfologiska grupper från färska, ofrysta prover. Renodling av svampar från frysta prover resulterade i färre antal isolat, klassificerade i 17 olika morfologiska grupper (se tabell 3). Resultatet av isolering av svampar från frysta prover från Östergötland bedömdes inte vara tillförlitlig och presenteras därför inte här.

**Tabell 3:** 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			neg. effekt	pos. effekt
Väster-götland	Färska prover	61	91	62	61	18	15
Öster-götland	Färska 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. Trettio 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 (bild 4 och bild 5). Sexton procent av svampisolaten som isolerats från färska 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 4).



**Bild 4:** Sänkt grobarhet och hämmad planttillväxt orsakade av svampar isolerade från fröskörden 2014



**Bild 5:** Sjukdomssymtom på rötter orsakade av svampar isolerade från fröskörden 2014

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.

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

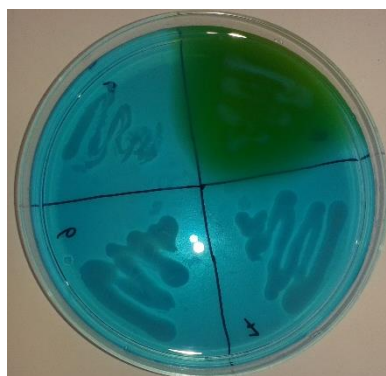
**Tabell 4:** Olika grader av hämmande effekt på grobarhet orsakade av utsädesburna svampar isolerade från fröskörden 2014 i biotest på åkerböna (sort Tattoo). Tabellen visar resultat från några utvalda isolat från olika morfologiska grupper med olika grader av skadlig effekt på åkerböna

#### Förstudier av ytterligare *Rhizobium*-stammar

Våra undersökningar med *Rhizobium*-bakterier i projektet hade hittills varit begränsade till ett fåtal bakteriestammar. Vi utökade därför studien till att innefatta även befintliga rhizobiumsamlingar vid SLU. Olika stammar från dessa samlingarna odlades upp och identifierades med klassiska metoder baserad på specifika odlingssubstrat, Yeast Mannitol Agar (YMA) och laktosagar (bild 6 och 7). Dessa två odlingsmedier används för att urskilja rhizobier från andra närbesläktade bakterier såsom *Agrobacterium*. Vi kunde dock inte bekräfta specificiteten hos dessa odlingsmedier, därför kompletterades identifieringen med DNA-baserade metoder.



**Bild 6.** YMA med kongoröd för att urskilja rhizobier (vita) från två icke-rhizobier (röda)



**Bild 7.** En *Agrobacterium* (grön) och tre rhizobier på laktos-agar

#### 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. Bakteriebetade 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.

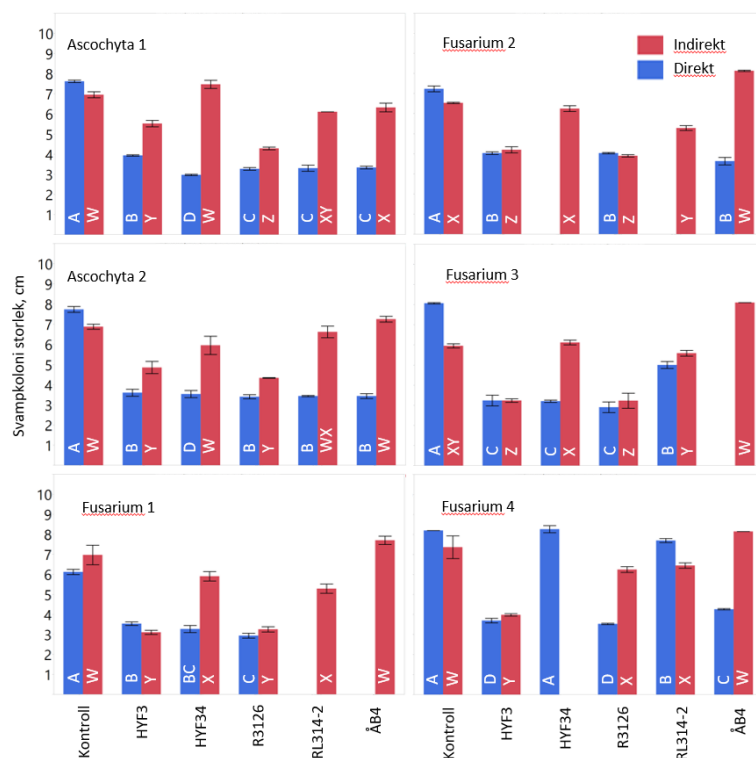
**Tabell 5.** Screening av 11 nyisolerade och 19 tidigare isolerade rhizobier avseende deras effekter i Totto i växthus. Resultat från 6 stammar redovisas här.

Rhizobiestam	Källa	Röd YMA	laktosagar	Antal grodda av 12	Plant längd (cm)	Plant torrvt (g)	Antal friska rotknölar
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 visade 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, tabell 5. Även negativa effekter noterades efter behandling med vissa rhizobier.

#### Hämning av skadesvampar på åkerböna av rhizobier och PGPB.

Fem rhizobie-stammar, 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 *Fusarium*-isolat vilka visat skadlig effekt i sundhetstestet beskrivet ovan, samt två tidigare renodlade isolat av *Ascochyta*, en känd patogen på åkerböna.



**Figur 11.** Resultat av laboratorietest av olika bakteriestammars hämmande effekt på sex olika svampisolat med skadlig effekt på åkerböna. Indirekt = effekt av volatila ämnen utsöndrade av bakterierna. Direkt=effekt av diffunderbara ämnen och näringskonkurrens.

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

Bakteriernas både indirekta (orsakad av volatila ämnen) och direkta (orsakad av diffunderbara ämnen) hämningsförmåga bestämdes. Framför allt hämning orsakad av utsöndring av svamphämmande ämnen och/eller näringskonkurrens (Direct=direkt effekt) kunde konstateras i laboratorieförsöken, se figur 11. Alla bakterier, utom *Fusarium* 4, gav signifikant hämning av alla svampisolat i testerna av direkt effekt.

## Fältförsök 2015

### Utsädesbehandling

Baserat på vunna resultat valde vi i att för 2015 års fältstudier använda *Rhizobium*-stammarna 3126, HYA34, HYF3, ÅB4 och 314-2 för att studera effekterna av dessa stammar enskilt och i saminokulering med S4 (*Serratia proteamaculans*). Utsädet till fältförsöken behandlades med de olika bakteriestammarna enskilt och i blandning med som beskrivits tidigare. Antal levande bakterier efter betningen bestämdes, se tabell 6. I kontrolleret användes obehandlat utsäde. Bakteriebetning hade inte någon negativ inverkan på grobarhet enligt sundhetstest utfört i växthuset (data ej visat).

**Tabell 6.** 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	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^5$
3. <i>Rhizobium</i> HYA34	$2 \times 10^3$	$2 \times 10^5$
4. <i>Rhizobium</i> HYF3	$4 \times 10^3$	$1 \times 10^5$
5. <i>Rhizobium leguminosarum</i> 314-2	$7 \times 10^3$	$5 \times 10^3$
6. <i>Rhizobium</i> ÅB4	$4 \times 10^4$	$2 \times 10^5$
7. <i>Serratia</i> S4	$2 \times 10^3$	$6 \times 10^3$
8. <i>Rhizobium</i> 3126+S4 (1:1)	$6 \times 10^3$	$5 \times 10^4$
9. <i>Rhizobium</i> HYA34+S4 (1:1)	$2 \times 10^3$	$1 \times 10^5$
10. <i>Rhizobium</i> HYF3+ <i>Serratia</i> S4 (1:1)	$3 \times 10^3$	$5 \times 10^4$
11. <i>Rhizobium leguminosarum</i> 314-2+ <i>Serratia</i> S4 (1:1)	$4 \times 10^3$	$6 \times 10^3$
12. <i>Rhizobium</i> ÅB4+S4 (1:1)	$2 \times 10^4$	$1 \times 10^5$

### Fältförsöksbeskrivning

Försöksplanen kom att bestå av tolv behandlingar (se tabell 4). Under 2015 valdes sockertillsatsen bort i fältförsöken för att ge möjlighet att få en tydligare bild av effekterna av bakterieympningen. 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). 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 7. Fältet i Södermanland var en mellanlera (pH 6.3, mullhalt 4.2 %, lerhalt 29 %, silt 47.5 % och sand 19.3%), liksom fältet i Östergötland (pH 7.0, mullhalt 5.0 %, ler 33.6 %, silt 46.9 % och sand 14.5 %).

### Statistisk behandling av resultaten

Alla statistiska analyser gjordes med JMP® 13.0.0. Plats- och sorteffekterna var signifikanta i många av fältförsöken, men eftersom det inte fanns några samspelseffekter för behandling redovisas alla resultat med behandling (bakteriebetning) som huvudeffekt. Student t-test användes för att jämföra medelvärden.

### Effekter av behandlingarna på uppkomst av åkerböna

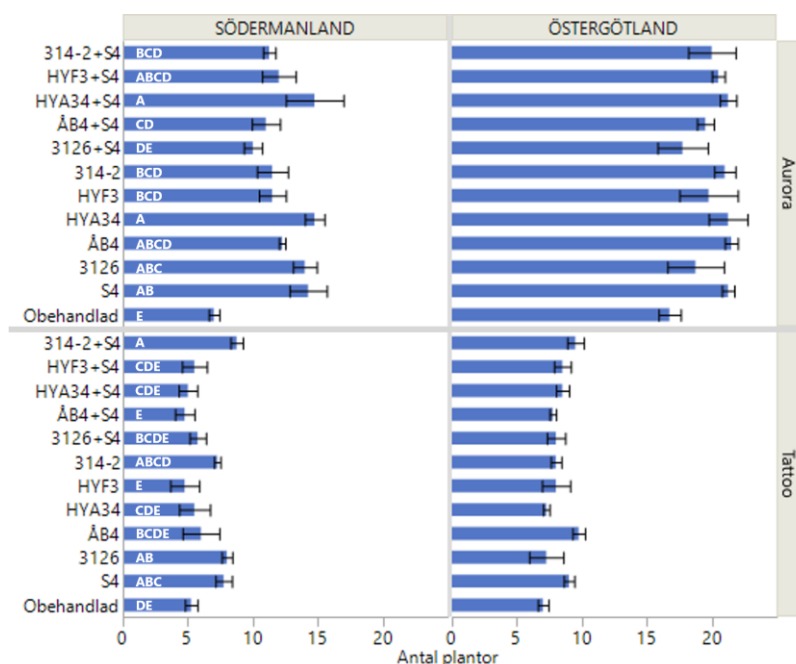
Fem veckor (Södermanland) respektive åtta veckor (Östergötland) efter sådd bestämdes antal uppkomna plantor och 10 plantor med pålrötter samlades in i alla parceller. Plantproverna graderades för förekomst av kväveknölar på pålroten och i möjligaste mån graden av rotinfektion.





**Bild 8.** Fältförsöket i Södermanland 2015 med åkerbönsorterna Aurora (de två mittersta rutorna) och Tattoo (rutorna längst till vänster respektive höger) efter bakteriebetning av utsädet.

Det fanns stora skillnader i uppkomst mellan försöksplats och sort (bild 8 och figur 12) i fältförsöken 2015. Sammantaget över alla behandlingar var uppkomsten bättre i försöket i Östergötland ( $p < 0,0001$ ). Aurorautsädet gav en signifikant bättre uppkomst än Tattoo i båda försöksfälten ( $p < 0,0001$ ). Inga skillnader mellan utsädesbehandlingarna 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 12.** Antal uppkomna plantor per tre sträckmeter fem veckor (Östergötland) respektive åtta veckor (Södermanland) efter sådd av bakteriebetad åkerböna i fältförsök.

Strecken representerar medel-felet. Staplar för behandling med olika bokstäver är signifikant åtskilda inom plats och sort (Student's  $t$ ,  $p < 0.05$ ).

### Effekter av behandlingarna på rotknölbildning

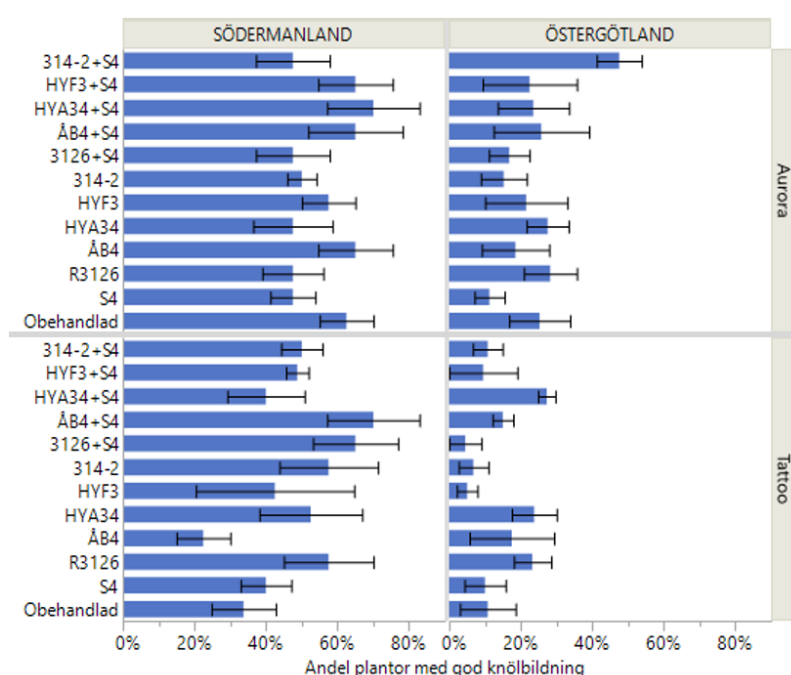
I Östergötlandsförsöket graderades knölbildning genom att bestämma andel plantor i klasserna 1-20, 20-40 respektive  $>40$  friska rotknölar på den övre delen av pålroten. I Södermanlandsförsöket, som provtogs senare än försöket i Östergötland, delades plantorna in i fyra klasser: 0 rotknölar, 1-10 små knölar, 5-10 stora knölar respektive  $>10$  stora friska rotknölar (bild 9). Andelen plantor med god knölbildning beräknades genom att addera antalet plantor i klassen med mest rotknölar (Södermanland,  $>10$  stora friska rotknölar; Östergötland,  $>40$  friska rotknölar) och dividera summan med total antalet graderade plantor, se figur 13.





**Bild 9.** Kväveknölar på pålrot av åkerböna.

Generellt var knölbildningen bättre i Aurora än i Tattoo på båda försöksplatserna ( $p < 0,0001$ ), och det skilde även signifikant mellan försöksplatserna ( $p < 0,0001$ ). Inga signifikanta skillnader mellan utsädesbehandlingarna kunde konstateras i försöken.

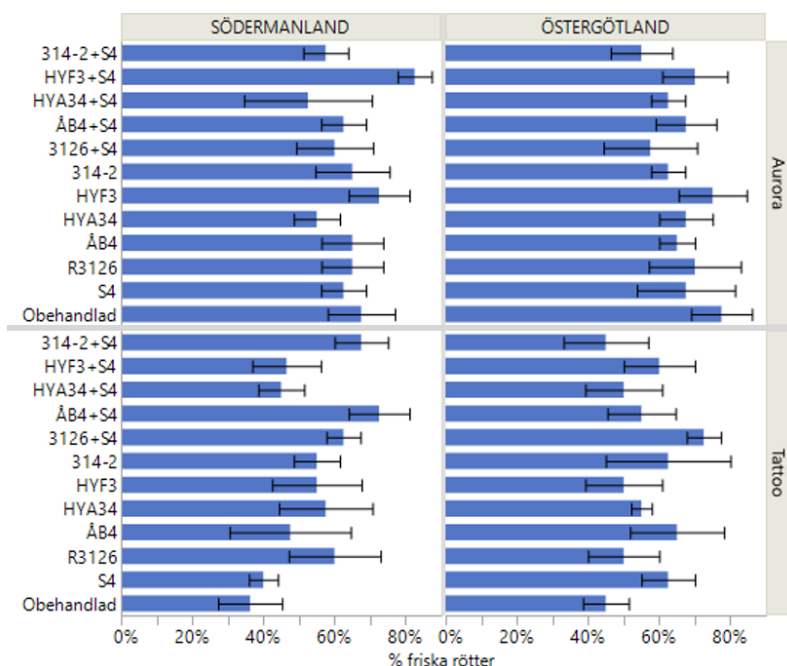


**Figur 13.** Andel plantor med god rotknölbildning (Östergötland, andel plantor med >40 knölar, Södermanland, andel plantor med > stora knölar) efter sådd av bakteriebetad åkerböna i fältförsök.

Strecken representerar medelfelet. Inga signifikanta skillnader mellan de olika behandlingarna kunde observeras i försöken.

#### 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 0,0115; Östergötland,  $p$ -värde 0,0039). Det fanns ingen signifikant skillnad mellan försöksplatserna. Inga signifikanta effekter av utsädesbetning med de olika bakterierna på andelen friska rötter kunde observeras (figur 14).

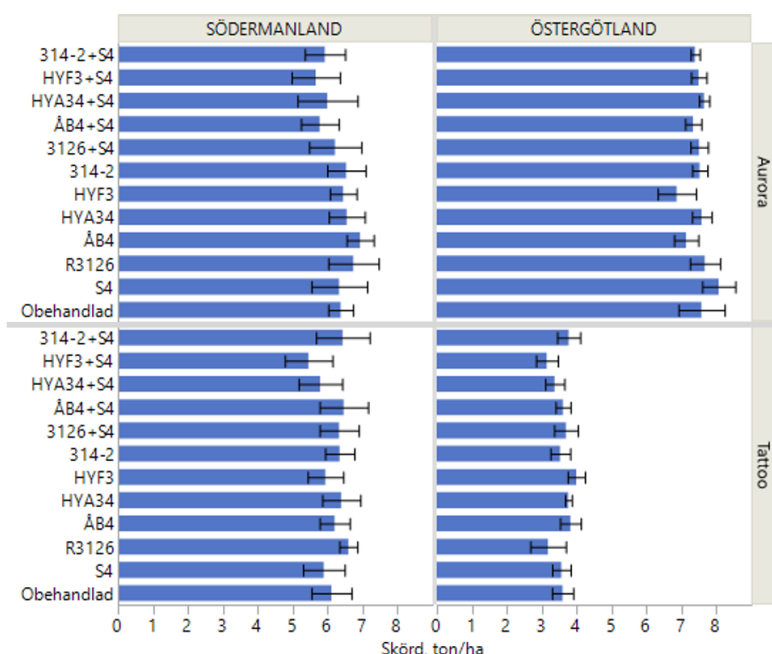


**Figur 14.** Andel plantor med friska rötter efter sådd av bakteriebetad åkerböna i fältförsök.

Strecken representerar medelfelet. Inga signifikanta skillnader mellan de olika behandlingarna kunde observeras i försöken.

#### Effekter av behandlingarna på skördenivå

Hektarskördarna var höga i försöken, se figur 15. 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 ( $p > 0,0001$ ). Det fanns även en signifikant, positiv korrelation mellan rotknölbildning och skörd i sorten Tattoo ( $R^2 = 0,40$ ,  $p < 0,0001$ ).



**Figur 15.** Skörd av åkerböna i fältförsök med utsädesbetning med bakterier år 2015.

Strecken representerar medelfelet. Inga signifikanta skillnader mellan de olika behandlingarna kunde observeras i försöken.

## Material och metoder samt resultat år 2016

### Fältförsök

Under 2016 fokuserades verksamheten på ett fältförsök för att ytterligare utvärdera vunna erfarenheter under fältförhållanden. Baserat på resultaten från 2014 och 2015 års fältstudier ingick behandlingar med bakteriestammarna *Rhizobium* 314, *Rhizobium* 3126, HYA34, ÅB4 i fältförsöket 2016. Dessa stammar användes för ympning med respektive utan inblandning av en tillväxtfrämjande bakterie (*Serratia* S4) på samma sätt som i fältförsöken 2015, se tabell 8. Ett utsädesparti av sorten Tattoo, med naturlig utsädessmitta användes i fältförsöket som lades ut i ett fält utanför Västerås.

Fröympningen 2015 gav lågt och ojämnt antal bakterier per frö, och detta kan ha påverkat resultaten i fältförsöken. Under 2016 använde vi en delvis ny teknik där vi ympade utsädet två gånger för att få en större och jämnare tillförsel av bakterier. Denna förändring i ympningsförfarandet gav dock inte någon förbättrad bakterieförekomst på utsädet, se tabell 6 och tabell 7.

**Tabell 7.** De olika behandlingarna i fältförsök med utsädesympning av åkerböna genomförda i Södermanland (Västerås) under 2016, och antal levande bakterier per frö efter betning.

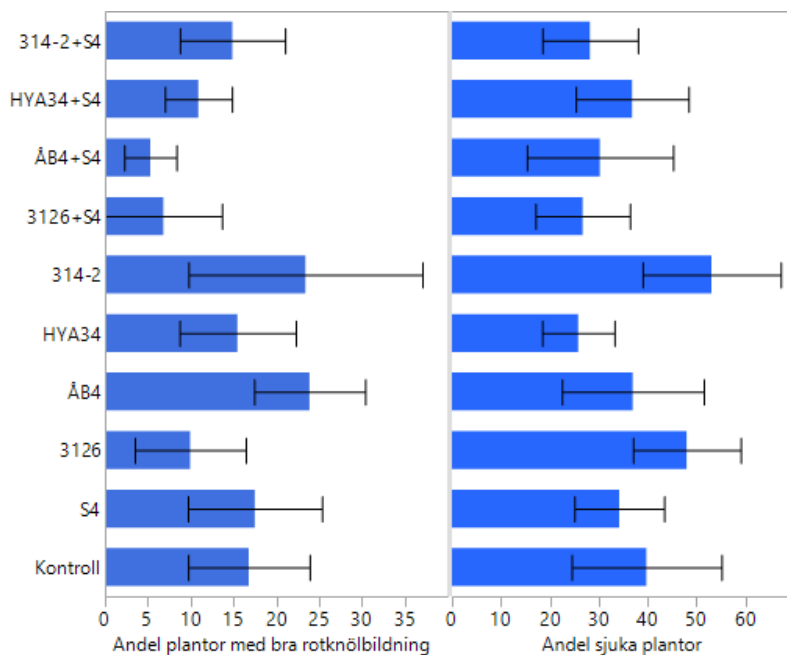
Behandling	Bakterier/frö
1. Kontroll	-
2. <i>Rhizobium</i> 3126	$4.0 \times 10^3$
3. <i>Rhizobium</i> HYA34	$2.0 \times 10^3$
4. <i>Rhizobium leguminosarum</i> 314-2	$7.5 \times 10^3$
5. <i>Rhizobium</i> ÅB4	$1.8 \times 10^4$
6. <i>Serratia</i> S4	$2.0 \times 10^3$
7. <i>Rhizobium</i> 3126 + <i>Serratia</i> S4	-
8. <i>Rhizobium</i> HYA34 + <i>Serratia</i> S4	-
9. <i>Rhizobium leguminosarum</i> 314-2 + <i>Serratia</i> S4	-
10. <i>Rhizobium</i> ÅB4 + <i>Serratia</i> S4	-

Antal bakterier per frö bestämdes bara i de led som ympades med enskilda stammar.

I försöket skulle behandlingarnas effekter på uppkomst, sjukdomsförekomst och skördenivå bestämmas. Det visade sig dock att uppkomsten i försöket var mycket dålig. Endast ca 10 – 15 % av de sådda fröna kom upp, och det fanns ingen skillnad mellan de olika behandlingarna. Vi var medvetna om att det utsädesparti som vi valde för försöket bar på en del smitta, men tidigare tester under kontrollerade förhållanden hade visat en grobarhet på 60 %. Detta bedömde vi vara tillräckligt för att använda i fält, men vid sådd i kall jord kunde troligen den utsädesburna smittan ge kraftigare angrepp som gjorde att en stor andel av fröna dog innan uppkomst. Den mycket dåliga uppkomsten gjorde att vi bedömde att försöket måste slopas.

### Effekter av behandlingarna på rotangrepp och rotknölbildning

I försöket togs dock plantprover för gradering av rotangrepp. Detta gjordes på samma sätt som i tidigare försök, 10 plantor med pålrot samlades per parcell och graderades efter förekomst av rotknölar och missfärgning. Rotknölbildning avlästes genom att räkna plantor i fyra klasser (klass 1= inga knölar, klass 2= 1 till 20 knölar, klass 3= 21 till 40 knölar, klass 4= mer än 40 knölar). Trots den av att döma av uppkomsten stora sjukdomsförekomsten var 65 % av rötterna friska, men inga statistiska skillnader kunde observeras vare sig i sjukdomsförekomst (missfärgning av rötterna) ( $p=0,8181$ ) eller i rotknölbildning ( $p=0,6357$ ), se figur 16.



**Figur 16.** Andel plantor med bra knölbildning och andel plantor med sjukdomssymtom hos åkerböna i fältförsök med utsädesbetning med bakterier år 2016.

Strecken representerar medelfelet. Inga signifikanta skillnader mellan de olika behandlingarna kunde observeras i försöken.

## Diskussion och slutsatser

Odlingen av åkerböna ökar snabbt i Sverige, och det är viktigt att ta fram nya metoder som kan bidra till en förbättrad säkerheten i odlingen. Det här redovisade projektet syftade till att studera effekter av utsädesympning av åkerböna med 1) enskilda bakterier och 2) potentiella synergieffekter mellan olika bakterier. Projektet har arbetat på bred front med en mängd olika *Rhizobium*-stammar och tillväxtfrämjande bakterier enskilt och i olika kombinationer. Den största delen av arbetet har genomförts under kontrollerande förhållanden på laboratoriet eller i växthus, men har följts upp med fältförsök för att verifiera eventuella behandlingseffekter under naturliga fältförhållanden. Projektets hypotes var att utsädesympning med kvävefixerande och/eller tillväxtfrämjande bakterier ger en bättre odlingsssäkerhet i åkerböna.

Några av de bakteriéstammar som undersöktes i växthusförsök visade lovande resultat med förbättrad uppkomst och bättre planttillväxt hos åkerböna. In vitro-testerna visade på en bred hämmande förmåga av olika bakterier på svampisolat med skadlig effekt på åkerböna. I projektet studerades effekten av tillsats av socker vid utsädesympningen. I detta projekt var teorin att en tillsats av socker vid ympningen skulle ge bättre förutsättningar för bakterierna på utsädet genom en tillförsel av en lättillgänglig kolkälla och därmed öka deras effekter på grödan. Jämförande studier under kontrollerade förhållande i växthus visade dock bara säkra effekter av tillsats av socker i ett fåtal fall. Anmärkningsvärt är att tillsats av enbart socker gav en signifikant bättre tillväxthastighet i krukförsök. I projektet studerades även sockertillsatsens effekt samhällsstrukturer hos bakterier i rotknölar av åkerböna. Resultaten visade på att sockret ökade diversiteten och påverkade fördelningen mellan olika arter i bakteriesamhället i rotknölar. Detta kan förklaras av en förändrad konkurrenssituation, där tillgång på lättåtkomligt kol ger möjlighet även för mindre konkurrenskraftiga bakterier att etablera sig i rotknölar. Vi vill dock poängtera att vi enbart bestämde förekomst av odlingsbara bakterier, och kompletterande analyser med icke-odlingsbar ansats baserad på molekylära metoder skulle därför behövas för att få en mera fullständig bild av bakteriesamhällen i rotknölar av åkerböna.

I fältförsöken hade försöksplats och sort hade en mycket stark effekt på många av de undersökta variablerna. De effekter av olika bakteriéstammar som observerades under kontrollerade förhållanden i laboratorium och växthus kunde dock mestadels inte återskapas under fältförhållanden. En förbättrad uppkomst jämfört med obehandlat led kunde observeras under fältförhållanden där flera av utsädesbehandlingarna gav en förbättrad uppkomst i fältförsöken, men inokulering med de olika bakteriéstammarna gav inga effekter på vare sig bildningen av rotknölar eller på angrepp av rotpatogener i fält. Skördenivån var genomgående hög i försöken, men påverkades inte av utsädesbehandlingarna. Inga synergieffekter från samympning med rhizobier och andra tillväxtfrämjande bakterier kunde konstateras hos dessa variabler.

Ett omfattande arbete gjordes för att analysera fröskörden från fältförsöken gjorda 2014 i Västergötland och Östergötland. Dessa undersökningar visade på stora skillnader i sundhet mellan de olika försöksplatserna. Sundheten var avsevärt sämre i skörden från försöket i Västergötland. Detta avspeglade sig i vad som kunde observeras i fältförsöken, med lägre uppkomst, knölbildning och skörd jämfört med Östergötlandsförsöket. Renodling av svampar från plantor med sjukdomssymtom (mörkfärgade rötter) från skördeproverna visade att flertalet av de artbestämda proverna var *Fusarium spp*, men även andra skadesvampar identifierades. *In vitro*-tester med dessa svampisolat från skördeproverna visade god hämmande effekt av flera bakterieisolat.

De lovande resultaten från laboratorie- och växthusundersökningarna gav förhoppningar om att positiva effekter av bakterieympning av åkerbönsutsäde skulle kunna uppnås även under fältförhållanden. Tanken var att bakteriebehandlingarna av utsädet skulle påverka rotknölbildning och sjukdomsförekomst och på det sättet öka grödans vitalitet och därmed avkastning i fält. En annan tanke med projektet vara att se om synergieffekter mellan kvävefixerande *Rhizobium*-arter och andra tillväxtfrämjande svampar på åkerböna genom samympning kunde höja effekterna av utsädesbehandlingarna. Under analyserna av resultaten från fältförsöken upptäcktes en positiv korrelation mellan rotknölsförekomst och skördenivå, vilket pekar på att det finns en potential hos utsädesympning i denna gröda.

Till vår besvikelse visade sig att trots att många av de testade bakterierna visade effekter under kontrollerade förhållanden, så var denna effekt för svag under fältförhållanden. Vare sig sockertillsats eller samympning gav signifikanta och stabila effekter av utsädesbetningen. Tyvärr var vi tvungna att slopa fältförsöket 2016 vilket gjorde att vi inte kunde göra större sammanställningar av resultaten över flera år.

I sammanfattning kan sägas att de bakteriestammar som användes för utsädesbehandling av åkerböna i projektet inte gav de positiva effekterna på grödan vi hoppats på, vare sig vid ympning enskilt, vid samympning eller vid ympning med tillsats av socker. Projektets huvudhypotes, att det finns en synergieffekt mellan rhizobier och tillväxtfrämjande bakterier vid samympning på utsäde av åkerböna kunde inte bekräftas, vare sig i under kontrollerade förhållanden eller i fältförsök. Det är känt att sambanden mellan försök under kontrollerade förhållanden inte alltid ger resultat som stämmer med resultat under fältförhållanden. Trots att flera av de bakteriestammar vi valde att använda i projektet var mycket väl studerade, kan detta ha bidragit till att de inte var de mest lämpade under fältförhållanden.

### Resultatredovisning och publicering

Resultat erhållna presenterades på Jordbruksverkets FoU dagar i Hässleholm den 4 mars 2015, och har diskuterats på flera rådgivar- och odlarmöten. Projektet har producerat ett examensarbete på masternivå av S. Akther vid SLU (30 hp), och ett projektarbete i biologi av E. Hnin vid Uppsala universitet (15 hp). På grund av att huvudsökande och ursprunglig projektansvarig har gått i pension har ytterligare publicering kraftigt försenats.

Uppsala, 2018-08-10



Björn Andersson, tf projektansvarig

## 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)
- Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. J. Nucl. Acids Res., 25: 3389-3402.
- Alström S and B Andersson 2011. Minskat svampangrepp och ökad skörd i raps med hjälp av bio-antagonister. Slutrapport till SLF, Stockholm
- Alström S and B Andersson 2012. Biologisk kontroll av jordburna sjukdomar i potatis. Slutrapport till SJV, Norrköping
- Gardes M, Bruns TD.1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts. J. Mol. Ecology, 2: 113-118.
- 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
- Lindén B. 2008. Efterverkan av olika förfrukter: inverkan på stråsådesgrödors avkastning och kvävetillgång - en litteraturöversikt. Rapport 14. SLU, Avdelningen för precisionsodling, Skara. <http://pub.epsilon.slu.se/3288/1/porapp14.pdf>
- Rodelas et al. 1999. Response of Faba bean (*Vicia faba*, L.) to combined inoculation with *Azotobacter* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*. Applied Soil Ecology, 12, 51-59.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J.1990.Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322.
- 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.