



Svampsamhällen och svampsjukdomar på åkerböna samt svamparnas inverkan på grobarheten



Christin Westman

Examensarbete, Agronomprogrammet, 30 hp

**Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi
Lovang Lantbrukskonsult AB
Uppsala/Vikingstad 2010
Sveriges Lantbruksuniversitet, SLU**

Sveriges Lantbruksuniversitet, SLU

Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi

Christin Westman

Svampsamhällen och svampsjukdomar på åkerböna samt svamparnas inverkan på grobarheten

Nyckelord: Åkerböna, svamp, T-RFLP, groningstest

Handledare: Eva Blixt, Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi, Annika Djurle, Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi och Anki Sjöberg, Lovang Lantbrukskonsult AB.

Examinator: Dan Funck-Jensen, Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi

Självständigt arbete i Biologi, magisterarbete 30 hp, Avancerad D

Kurskod: EX0564

Uppsala 2010

Omslagsbild: Åkerbönor med färgvariation.

Fotograf: Christin Westman, 2010.

FÖRORD

Detta examensarbete är ett samarbete mellan Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi, SLU och Lovang Lantbrukskonsult AB, Vikingstad. Studien har genomförts på Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi vid Sveriges lantbruksuniversitet med Eva Blixt som handledare, Annika Djurle som biträdande handledare samt Anki Sjöberg som extern handledare.

Jag vill framföra ett tack till Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi som gjort det möjligt för mig att genomföra denna studie. Katarina Ihrmark, Ylva Persson och Lina Grönberg och Björn Lindahl samt alla andra som hjälpt mig och bidragit med nödvändig kunskap under arbetets gång skall också ha ett tack.

Ett stort tack riktas till min huvudhandledare Eva Blixt på Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi, SLU som hjälpt mig och ställt upp under hela arbetets gång. Dessutom vill jag tacka Annika Djurle på Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi, SLU samt Anki Sjöberg och Ulrik Lovang på Lovang Lantbrukskonsult AB som bidragit med nödvändigt material och kunskap under studien. Jag vill också tacka alla lantbrukare som bidragit med åkerbönor till studien och Cecilia Lerenius på Växtskyddscentralen för de bilder jag får använda.

Jag vill även tacka Stiftelsen Stina Werners fond, Skogssällskapet i Göteborg för den finansiering de bidragit med.

Uppsala 2010

Christin Westman

SUMMARY

Broad beans are becoming a larger crop in Sweden. This is probably due to the current discussion about the cultivation of soya beans that are imported to be used as protein fodder. Broad beans are a good break crop in a small grain intensive crop rotation and works as a protein source for animals together with for example ley. At present little research has been done on broad beans and more knowledge is needed.

This study is about fungal communities and diseases on broad beans and the impact of these fungi on seed germination. Broad beans from 14 fields were collected and used during the study, ten from the county of Östergötland and four from the county of Västergötland.

Fungi on harvested broad beans were identified by using terminal restriction fragment length polymorphism, (T-RFLP), where the internal transcribed spacer (ITS) region in the fungal DNA, which is unique for each species, is used. For identification of fungal species a reference library was prepared from the ITS sequences of pure isolations of fungi on the beans and the inserted fungal ITS sequences in cloned *Escherichia coli* bacteria. The ITS regions were sequenced and identified to species or genus level using BLASTN at GeneBank in order to use them as a reference library. The results from the T-RFLP were then compared with the reference library. The fungi that were identified on the broad beans with this method were *Ascochyta fabae*, *Alternaria infectoria*, *Botrytis cinerea*, *Hypocrea viridescens*, *Arthrinum arundinis*, *Phoma exigua* var. *exigua*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Mucor circinelloides*, *Lichtheimia corymbifera*, *Cladosporium* sp, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Ascochyta* sp., and *Chaetomium* sp. Four of these fungi are plant pathogens, one is a yeast fungus and the rest are saprophytes. By cloning *Ascochyta* sp. and *Cladosporium* sp. were identified. Of the 14 fungi in the reference library, ten could be found on the bean samples. The species that were only found among the pure isolates and not on the bean samples were *Mucor circinelloides*, *Lichtheimia corymbifera*, *Alternaria* sp. and *Fusarium* sp.

A germination test showed that the germination rate was between 89-99 % for each field sample. The sample with the lowest percentage also had the highest number of identified fungi on the beans. This shows that the fungi may have an impact on the germination on broad beans.

Keywords: Broad bean, fungi, T-RFLP, germination test

SAMMANFATTNING

Antalet odlade hektar med åkerböna har ökat de senaste åren. Detta beror antagligen på den rådande diskussionen om importen av sojaböna vilka används som proteinfoder här i Sverige. Åkerböna fungerar bra som avbrottsgröda i spannmålsintensiva växtföljder och är lämplig att använda som proteinfoder tillsammans med exempelvis vall. Hittills har forskningen som gjorts på åkerböna varit begränsad och mer kunskap behövs.

Detta examensarbete handlar om svampsamhällen och svampar på åkerböna, samt om svamparna har någon inverkan på åkerböns grobarhet. Åkerböna från 14 olika fält, tio från Östergötland och fyra från Västergötland användes under studien.

Svampar på skördade åkerböna identifierades med hjälp av terminal restriction fragment length polymorphism, (T-RFLP), vilket innebär att svamparnas ITS-region (internal transcribed spacer) amplifieras och klipps med enzymer för att sedan jämföras med identifierade sekvenser. ITS-regionen är unik i sekvens och fragmentlängd för varje svampart vilket gör det möjligt att identifiera svamparna. För att kunna identifiera svamparna på böna gjordes ett referensbibliotek av ITS-regionen hos de renodlade svamparna som fanns på böna, samt randomiserade ITS-regioner som klonats in i bakterier. Svamparna från renodlingen och kloningen sekvenserades och artbestämde med hjälp av publicerade sekvenser på GeneBank. De artbestämda svamparna användes sedan i ett referensbibliotek, då de specifika sekvenserna och fragmentlängderna kopplats till en specifik svampart.

Resultatet från analys med T-RFLP jämfördes sedan med referensbiblioteket. De svampar som identifierades på böna var *Ascochyta fabae*, *Alternaria infectoria*, *Botrytis cinerea*, *Hypocrea viridescens*, *Arthrinum arundinis*, *Phoma exigua* var. *exigua*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Mucor circinelloides*, *Lichtheimia corymbifera*, *Cladosporium* sp, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Ascochyta* sp., och *Chaetomium* sp. Av dessa är fyra växtpatogena svampar, en är en jästsvamp och resten saprofyter. Kloningen resulterade enbart i identifiering av svampsläkterna *Ascochyta* sp. och *Cladosporium* sp. Tio utav de fjorton svamparna i referensbiblioteket kunde hittas bland böna. De arter som inte kunde hittas på böna utan endast vid renodlingen var *Mucor circinelloides*, *Lichtheimia corymbifera*, *Alternaria* sp. och *Fusarium* sp.

Ett grobarhetstest visade att grobarheten varierade mellan 88-99 % för varje fältprov. Den lägsta grobarheten hade det fält som också hade det största antalet identifierade svamparter. Detta kan betyda att en större svampförekomst ger åkerböna sämre grobarhet.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SUMMARY	4
SAMMANFATTNING	5
INNEHÅLLSFÖRTECKNING	6
INLEDNING	7
LITTERATURSAMMANSTÄLLNING	7
Åkerböna	7
Svampsjukdomar på åkerböna	9
Bönfläcksjuka	9
Chokladfläcksjuka	10
Bönbladmögel	12
Bönrost	13
<i>Alternaria</i> spp.	14
<i>Botrytis cinerea/ Botryotinia fuckeliana</i>	14
Metoder för att identifiera svampsamhällen	15
EXPERIMENTELL DEL:	
Material och metoder	16
Grobarhetstest	16
DNA-extraktion	17
Renodling av svampar till referensbibliotek	17
Kloning av svampar till referensbibliotek	18
Identifiering av svamparter på åkerbönor	18
Analys av resultat	19
Resultat	19
Grobarhetstest	19
Referensbibliotek	19
Identifiering av svamparter på åkerbönor	20
Analys av svampsamhällen i åkerböna	23
Diskussion	25
SLUTSATSER	28
ÅKERBÖNODLINGENS FRAMTID	29
LITTERATURFÖRTECKNING	30
APPENDIX 1	33

INLEDNING

Åkerböna är en gröda vars odling åter är på uppgång i Sverige, vilket sannolikt är på grund av den pågående diskussionen om import av soja, där miljöaspekterna är viktiga. Självförsörjning av en proteinfodergröda är önskvärd, eftersom det i nuläget används importerad soja i foderstaten till svin, fjäderfä och nötdjur. Detta kan ge stora utmaningar då inte alla proteingrödor går att odla i Sverige, men åkerböna är ett alternativ som ställs mot sojan. Odlingen av soja innebär en stor miljöbelastning då mycket bekämpningsmedel används i de länder där sojaböner odlas (Sp Sveriges Tekniska forskningsinstitut, 2010). Åkerböna fungerar också bra som en avbrottsgröda i spannmålsintensiva lantbruk i stället för ärter, bland annat på grund av att ärtrotörta inte är ett problem vid åkerbönodling. Odling av åkerböna i stället för ärter är också ett bra alternativ om befintlig mark består av styv lera eftersom åkerbönan trivs på sådana jordar. Åkerbönan kraftiga rötter har en bra luckrande effekt och tillför, liksom ärter, kväve till marken med hjälp av kvävebindande bakterier i rotsystemet.

Forskningen rörande åkerböna är begränsad och mer forskning behövs, och speciellt om odlingen fortsätter att öka som den gör nu. En ökad odling kommer antagligen leda till ökad förekomst av sjukdomar. Syftet med detta projekt var att få mer kunskap om vilka svampar som kan hittas på åkerböner genom att identifiera svampsamhällen och beskriva dessa samt att undersöka om det finns någon inverkan på åkerbönan grobarhet på grund av svampförekomst.

LITTERATURSAMMANSTÄLLNING

Åkerböna

På våra breddgrader är åkerbönan en ettårig vårgroende ört. Ursprungligen kommer den från den västra delen av den "bördiga halvmånen", d.v.s. Mellanöstern. Åkerböner odlas fortfarande mycket i till exempel Egypten och Etiopen, men den största odlingen finns i Kina. Sammanlagt odlas det cirka 2 miljoner hektar åkerböner i världen (Fogelfors, 2001). I Sverige odlades det år 2009 nästan 8000 hektar åkerböner, men arealen varierar väldigt mycket från år till år. År 2009 blev det rekordskördar på 3280 kg per hektar i genomsnitt i Sverige. Detta var den högsta noteringen sedan åkerbönan togs med i skördestatistiken, år 2003 (Statistiska centralbyrån, 2010). Dagens sorter av åkerböna som används i lantbruket har förädlats fram från den större hästbönan (Johansson, 1999). I Sverige används åkerbönan som proteinfoder. Nackdelen är att proteinet inte är lika lättillgängligt som i sojabönan men metoder för proteinomvandling är under utveckling (Ulrik Lovang, Lovanggruppen, personlig kommunikation).

Åkerböner har en lång växtsäsong och bör därför sås tidigt under våren för att hinna mogna under säsongen. Sådjupet ska vara 6-8 cm. Plantantalet vid sådd bör vara omkring 60-80 plantor/ m² vid normalt radavstånd vilket gör att en normal utsädesmängd är cirka 225-300 kg/ha. Det är mycket stora skillnader i frövik, vilket gör att det är viktigt att ta reda på vilken utsädesmängd som gäller för sorten som valts. Dessutom påverkas utsädesmängden av grobarheten (Johansson, 1999).

Utsädesmängden räknas ut med hjälp av följande formel:

Utsädesmängden i kg/ha = tusenkornvikten i gram x önskat antal plantor per kvadratmeter x fröets grobarhet i procent (Holstmark, 2007)

Skörden av åkerböna sker med hänsyn till den optimala proteinkvaliteten och när alla frön i baljorna är välutvecklade, samt när 50-58 % av bladen under de nedersta baljorna har fallit av (Johansson, 1999). En stor fördel med åkerböna är att det sällan är bråttom med tröskning då grödan varken lägger sig ner eller drösar. Bönorna är tröskmogna när halmen är svart och det inte går att rispa bönorna med nageln. Det går också att skörda bönorna som helsäd vid samodling med till exempel vete. Detta ensileras och används sedan som foder. Skörden sker då cirka två veckor efter att spannmålen gått i ax och baljväxten har börjat sätta baljor (Swensson, 2006).

Åkerbönplantan har ett rotsystem som består av en kraftig huvudrot med sidorötter. På välstrukturerad jord har ett rotdjup på 1,7 meter uppmätts. De flesta rötterna finns dock i matjorden. På grund av att rotsystemet inte är tillräckligt finfördelat är åkerbönan torkkänslig och kräver därför odling på jordar med god vattenhållande förmåga såsom lerjordar (Fogelfors, 2001). Åkerböna har en hög proteinhalt, 29-33 % beroende på odlingsförutsättningarna, och den varierar mellan olika sorter. Åkerbönor är kvävefixerare och behöver sällan ympas med baljväxtbakterier. Bönornas tidiga tillväxt är långsam och därför kan ogräskonkurrensen vara ett problem (Boström, 2004). Radhackning eller ogräsharvning bör göras för att hålla ogräsen borta, vilket bönorna tolererar mycket väl. Ogräsharvning kan göras fram till dess att bönorna är 10-12 cm höga (Swensson, 2006). Ogräsen har också goda chanser att hinna sprida sina fröer på sensommaren och hösten eftersom åkerbönan tröskas sent. Det kan ge ogräsproblem senare i växtföljden (Boström, 2004). Dessutom har åkerbönan ett visst förfruktsvärde på grund av sin kväveverkan på cirka 20 kg N/ha. Förfruktseffekten av åkerböna är att den kan ge en skördeökning hos stråsåd på omkring 10-12 % jämfört med ensidig stråsådesodling (Lindén, 2008). Åkerbönan är både självpollinerare och korsbefruktare. Om det finns bisamhällen i närheten av ett åkerbönsfält kan detta bidra till en bättre och jämnare baljsättning då bin hjälper till med pollineringen (Johansson, 1999).

Odlingen av åkerböna är i dagsläget begränsad, vilket har påverkat insatserna inom växtförädlingen. När nya sorter utvecklas fokuseras det i första hand på avkastning och tidighet, därefter stjälkstyrka och fröstorlek, och till sist vitblommighet (på grund av tanninhalten) samt kvalitets- och sjukdomsproblem (Johansson, 1999).

I Sverige odlas ett fåtal sorter av åkerböna. Aurora är en brokblommig sort vilket betyder att den har högre tanninhalten än de vitblommiga sorterna. På grund av detta lämpar sig denna sort bäst till nötkreatur, som är mindre känsliga för en hög tanninhalten än vad svin och fjäderfä är. Sorten är odlingssäker, stabil och har relativt god ogräskonkurrerande förmåga och den mognar medelsent. Två vitblommiga sorter är Gloria och Colombo. Dessa mognar några dagar tidigare än Aurora men har kortare stjäklängd och något lägre avkastning. En annan vitblommig sort är Paloma som är storfröig, har god stjälkstyrka och är medeltidig (Holstmark, 2007).

Svampsjukdomar på åkerböna

De vanligaste svampsjukdomarna som förekommer på åkerböna är chokladfläcksjuka, bönfläcksjuka och bönbladmögel (Hill, 2005). Dessutom förekommer det bönrost i Sverige. Även andra svampar såsom *Fusarium* sp., *Pythium* sp. och *Sclerotinia sclerotiorum* kan hittas (Djurle, 2006). Svamparna kan angripa eller finnas bland annat på bladen, fröerna eller på rötterna (Tabell 1.). Den enda svamp som är strikt utsädesburen på åkerböna är *Ascochyta fabae* som orsakar bönfläcksjuka.

Tabell 1. De vanligaste svampsjukdomarna på åkerböna, samt var på plantan de angriper/påträffas.

Sjukdom/Symptom	Patogen	Blad	Frö ¹	Rot
Bladfläckar	<i>Alternaria</i> spp.	x	x	
Chokladfläcksjuka	<i>Botrytis fabae</i>	x	(x)	
Bönfläcksjuka	<i>Ascochyta fabae</i>	x	x	
Bönbladmögel	<i>Peronospora viciae</i>	x	(x)	
Bönrost	<i>Uromyces viciae-fabae</i>	x	x	
Bomullsmögel	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	x	x	x
Gråmögel	<i>Botrytis cinerea</i>	x	(x)	x
Rotröta	<i>Pythium</i> sp.		(x)	x
Rotröta	<i>Fusarium</i> sp.	x	(x)	x
Groddbränna	<i>Rhizoctonia solani</i>		(x)	x

¹ (X) betyder att svampen kan påträffas på fröet, men den anses inte ha någon betydelse för utveckling av angrepp.

Det finns få bekämpningsmedel mot svampsjukdomar i åkerböna. Idag finns det två registrerade preparat på marknaden, Amistar och Signum. Endast ett fåtal fältförsök för att jämföra olika fungiciders effekt mot svampsjukdomar i åkerböna har genomförts i Sverige. och på grund av detta är kunskapen begränsad (Lerenius, 2006).

Nedan presenteras ett urval av sjukdomar som angriper åkerböna på blad och baljor och som kan överföras via utsädet.

Bönfläcksjuka

Bönfläcksjuka på åkerböna orsakas av svampen *Ascochyta fabae*. Svampen har ett perfekt stadium (*Didymella fabae*) som uppstår när sexuell förökning inträffar mellan svampens två olika parningstyper. Det sexuella stadiet har påträffats i flera länder och har antagligen stor inverkan på bönfläcksjukans epidemiologi (Jellis & Punithalingam, 1991; Kaiser, 1997). De båda stadierna av svampen angriper blad, baljor och stjälkar. Frön som blivit angripna kan bli små och skrupna (Hill, 2005). På stjälken är fläckarna långsträckta och går djupt ner i vävnaden. Angripna baljor får mörka fläckar som också är insjunkna. Fläckarna som bildas på bladen är bruna eller grå, runda och omgivna av en tydlig mörk rand (Fig. 1) (Stoddard *et al.*, 2010). Det går att skilja ut bönfläcksjukan från chokladfläcksjukan genom att *A. fabae* bildar pyknidier, som syns som svarta små upphöjningar i fläckarnas mitt. Dessutom ger *A. fabae* ofta större och färre fläckar än *Botrytis fabae* som i stället ger små och fler fläckar (Gunnarsson, 1987). *A. fabae* kan överleva på utsäde och på växtrester i fält. I det sexuella stadiet bildas ascosporer som kan spridas med hjälp av vinden inom och mellan fält. I det asexuella stadiet bildas pyknider innehållande konidier som sprids med skvättande

vattendroppar vid regn (Fig. 2). Svampen är utsädesburen vilket gör att den kan spridas till nya fält och områden (Djurle, 2006). Denna svamp gynnas av fuktigt väder, men den trivs bra i lite svalare temperaturer vilket gör att den kan angripa åkerbönsplantorna tidigt på våren. Den främsta kontrollåtgärden mot böNFLÄCKSJUKA är att alltid använda friskt utsäde. Dessutom kan den kontrolleras genom att alltid ha minst två års intervall mellan odling av åkerböna samt noggrann nedplöjning av växtrester (Gunnarsson, 1987). Det finns ett betningsmedel, Apron XL, som är registrerat och godkänt till bönor men det används sällan (Kemikalieinspektionen, 2010).



Fig. 1. BöNFLÄCKSJUKA (Lerenius, 2007).

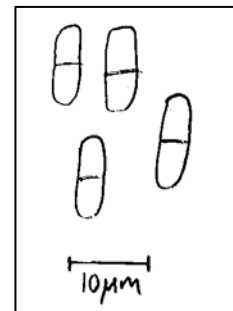


Fig. 2. Konidier av *Ascochyta fabae* (Westman, 2010).

Chokladfläcksjuka

Svampen som orsakar chokladfläcksjuka på åkerbönor heter *Botrytis fabae*. Den har även påträffats på *Phaseolus*-böna, linser och ärter. Chokladfläcksjuka är en av de mest ekonomiskt betydelsefulla sjukdomarna på åkerböna, speciellt då varmt och fuktigt väder kan göra angreppen mycket allvarliga. Angrepp av svampen visar sig som små chokladbruna runda fläckar vilka sjukdomen också fått sitt namn från (Fig. 3). De större, äldre fläckarna ser lite annorlunda ut med sin mörkare bruna eller rödaktiga kant runt den ljusare mitten. Gränsen mot frisk vävnad är alltid tydlig. Blommor, baljor och stjälkar kan också angripas. Symtomen på stjälkarna är mörka längsgående streck (Gunnarsson, 1987). *B. fabae* har två angreppsfaser, en aggressiv och en icke-aggressiv. Den icke-aggressiva fasen visar sig som små bladfläckar, främst på de äldre bladen, medan den aggressiva fasen inträffar om gynnsamma väderleksförhållanden, fuktigt och varmt, uppstår (Fig. 4). Under det aggressiva stadiet utvecklas bladfläckarna till stora partier vilket gör att bladen vissnar och sedan faller av (Stoddard *et al.*, 2010).

Svampen överlever som sklerotier eller mycel i jorden och på växtrester (Smith *et al.*, 1988). Sklerotiernas överlevnad minskar om de ligger djupt begravda. Detta är troligtvis på grund av jordsvampen *Gliocladium roseum*, som kan fungera som en parasit på *B. fabae* (Gunnarsson, 1987). *B. fabae* kan även hittas på utsäde men spridningen med utsäde har dock inte lika stor betydelse. Smitta på utsäde kan dock göra att svampen sprids till nya fält. Försök har visat att utsädessmittan inte är av betydelse eftersom ingen smitta kunde hittas i ett parti efter lagring, trots att *B. fabae* kunde påvisas vid skörd. Detta tyder på att *B. fabae* inte kan överleva på torra frön under en längre tid. Försöket visade också att även om utsädet är smittat behöver smittograden vara mycket hög för att plantan sedan ska skadas. Under försöket isolerades svampen bland annat från börnornas yttre skal. Det gick inte att hitta någon infektion djupare in i fröet, utan infektionen fanns endast i det yttre skalet (Harrison, 1978).



Fig. 3. Chokladfläcksjuka (Lerenius, 2007)



Fig. 4. Chokladfläcksjuka på åkerbönsblad (Lerenius, 2007)

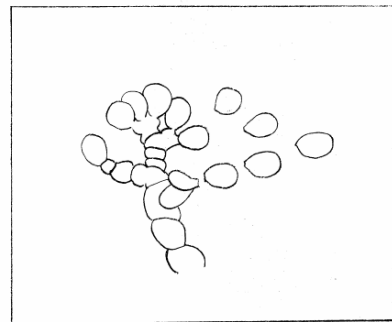


Fig. 5. Konidier av *Botrytis fabae*, 500 ggr förstoring, (Gunnarsson, 1987)

Efter att svampen övervintrat kommer den under fuktiga förhållanden på våren att bilda konidier (Fig. 5), som sprids med hjälp av vind och vattenstänk till värdväxter och nya fält. Konidierna behöver fritt vatten på värdväxten för att kunna gro och infektera, varvid angreppen ofta utvecklas efter regnperioder (Gunnarsson, 1987). Optimal temperatur för svampens utveckling är 20 °C. Dessutom spelar luftfuktigheten en viktig roll i sjukdomsutvecklingen där den optimala luftfuktigheten är 88-100 % (Stoddard *et al.*, 2010). Plantans ålder påverkar mottagligheten för chokladfläcksjuka på det sättet att mottagligheten ökar när plantan är två till sju veckor gammal. Baljornas mottaglighet minskar däremot med åldern. Om plantan lider av kalciumbrist försvagas den och kan lättare infekteras, vilket troligtvis beror på att cellväggarna blir svagare och att det då blir lättare för svampen att ta sig igenom cellväggarna. Kalciumbrist hänger även ihop med att ett lågt pH i marken försämrar åkerbönsans förmåga att ta upp näringsämnen, vilket ökar risken för chokladfläcksjuka. Skördeförlusterna på grund av chokladfläcksjuka varierar mycket och är större på höståkerbönsor, som till exempel odlas i England, än på våråkerbönsor som odlas i Norden. Detta händer på grund av att sjukdomen ofta angriper sent på växtsäsongen här och gör då mindre skada. Om det för svampen råder gynnsamma förhållanden kan tidigare angrepp göra

stor skada (Gunnarsson, 1987). Ett sent angrepp kan dock vara positivt då det gör att åkerbönorna mognar snabbare än normalt vilket är önskvärt (Johansson, 1999).

Det finns kontrollåtgärder för att förhindra eller minska angrepp av chokladfläcksjuka vid ekologisk och konventionell odling och det är bland annat att ha en växtföljd med minst två år mellan åkerbönor på samma fält, måttligt täta bestånd, ha en bra ogräskontroll och väl-dränerade fält (Gunnarsson, 1987). Dessutom bör skörderester plöjas ner ordentligt för att minska övervintringen av svampen. Odling av mer motståndskraftiga sorter, såsom Aurora och Gloria, och till sist att odla på lerjord med god tillgång på viktiga näringsämnen såsom kalcium, fosfor, kalium och magnesium är också åtgärder som går att genomföra. Detta medför att åkerbönorna blir friskare och då motståndskraftigare mot svampar (Hill, 2005).

Bönbladmögel

Bönbladmögel orsakas av *Peronospora viciae*, som inte är en äkta svamp utan en oomycet och är besläktad med arter som orsakar ärtrottröta (*Aphanomyces euteiches*) och potatisbladmögel (*Phytophthora infestans*) (Djurle, 2006). *P. viciae* bildar vilosporer, (oosporer), som kan överleva i marken och på växtrester under flera år. Det medför att odling av åkerböna inte bör ske oftare än en gång i en växtföljd som är fem till sju år (Hill, 2005). Dessutom bör smittade växtrester tas bort från fältet och djup plöjning är nödvändig. Sporer sprids med vind och vatten, men spridningen med utsäde är försumbar (Smith *et al.*, 1988). Mycel och oosporer kan hittas på och i fröskalet, men det finns inga rapporter om att infektion från frö till grodd inträffar. Det är i stället oosporerna i marken som är den viktigaste primära smittkällan. Konidierna som bildas är 21-27 µm långa (Fig. 6) (Stegmark, 1994).

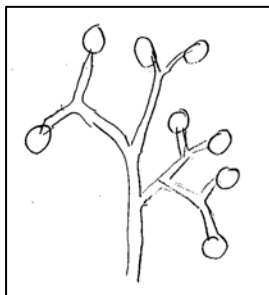


Fig. 6. Konidiofor med 21-27µm långa konidier av *Peronospora viciae* (Westman, 2010).



Fig. 7. Bönbladmögel på åkerbönsblad (Lerenius, 2007)



Fig. 8. Bönbladmögel (Lerenius, 2007)

Symptom på bönbladmögel börjar med ljusa fläckar (kloroser) på de yngsta bladens ovansidor (Fig. 7). Fläckarna kan dessutom ha en rödbrun kant mot den friska vävnaden. På undersidan av de ljusa fläckarna finns det karakteristiska vitgrå-gråvioletta filtbildande mycelet (Fig. 8). Fläckarna kan täcka hela bladen och till slut mörknar fläckarna och bladen vissnar. Sjukdomen drabbar mestadels de yngre delarna av plantan och ett tidigt angrepp kan stoppa utvecklingen helt om tillväxtpunkten angrips. Om väderleksförhållandena är bra, fuktigt och relativt svalt och angreppet kommer tidigt, kan sjukdomen ge stora skördeföruster. Dock är inte detta vanligt då plantorna har förmågan att ofta växa ifrån angrepp (Gunnarsson, 1987).

Bönrost

Bönrost på åkerböna orsakas av svampen *Uromyces viciae-fabae*. Symptomen är tydliga pustlar på bladen (Fig. 9). Denna rostsvamp överlever som mycel på växtrester i fält och på utsäde i stället för att värdväxla som många andra rostsvampar gör (Voegelé, 2006; Agrios, 2005). Denna svamp kan vara utsädesburen, men fröerna måste då varit i kontakt med infekterat växtmaterial (CABI, 2010). Rostsvampen har fem olika sporformer vilka alla går att finna på åkerböna. Teliosporerna är de sporer som övervintrar på växtrester. Efter infektion av teliosporer produceras sedan basidiosporer som infekterar blad. Efter bladinfektion utvecklas pyknier och därefter aecier vars aeciosporer infekterar växten igen. Från de nya infektionerna produceras asexuella urediniosporer i enorma mängder i fält under säsongen i upprepade infektionscykler (Fig. 10). Dessa kan sedan spridas inom och mellan fält med vinden. De kan spridas över väldigt stora områden. Urediniosporerna producerar sedan teliosporer i slutet av säsongen, vilka sedan kan övervintra på växtrester. Angrepp vid frösättning kan ge stora skördeföruster (Voegelé, 2006; Agrios, 2005). I Sverige förekommer det angrepp av bönrost men de kommer ofta sent och leder sällan till stora skördeföruster. Kontrollåtgärder mot bönrost innebär att vara noggrann med nedbrukningen av alla växtrester för att förhindra spridning av sporer till nya åkerbönsfält följande år. Dessutom bör utsädet härröra från fält där inte bönrost hittats under säsongen (Djurle, 2006).



Fig. 9. Bönrost på åkerböna (Lerenius, 2007)

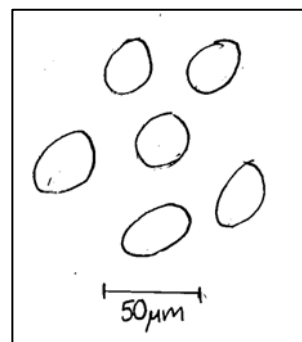


Fig. 10. Urediniosporer av *Uromyces viciae-fabae* (Westman, 2010).

***Alternaria* spp.**

Sjukdomar som orsakas av *Alternaria* spp. är bland de vanligaste i världen. Svamparna kan angripa stjälken, blommorna, bladen och frukterna hos de flesta växter. Sjukdomar som orsakas av *Alternaria* spp. syns ofta som bladfläckar men även som rotröta och röta i frukter. Fläckar på blad som orsakas av *Alternaria*-arter är ofta mörkbruna eller svarta. Dessutom är de ofta många och kan flyta ihop till större områden. Angrepp av *Alternaria* på åkerböna kan förväxlas med angrepp av *Ascochyta fabae*. De uppträder sent på säsongen och har liten betydelse. Släktet *Alternaria* har mörkt mycelium och det bildar konidioforer med konidier direkt från ytan av äldre angripna vävnad. Konidierna kan vara stora, mörka, långa och päronformade. Storleken och formen varierar mycket (Fig. 11). De lossnar lätt från konidioforerna och sprids med vinden. Många *Alternaria*-arter är saprofyter, vilket betyder att de inte kan infektera frisk vävnad utan behöver död vävnad för att föröka sig. Därför är det ibland svårt att säga om det är *Alternaria* sp. som orsakar sjukdomen eller om det är en sekundär kontaminering. Många *Alternaria*-arter producerar toxiner. Arterna övervintrar som mycel eller sporer i växtrester eller på frön. De producerar fler sporer om det regnar mycket och sporererna kan då spridas och infektera vävnad och bilda nya konidier (Agrios, 2005).

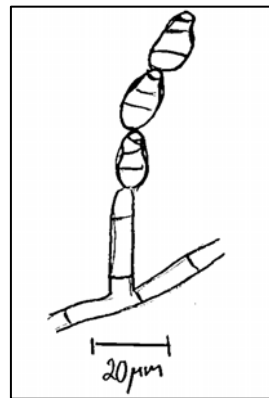


Fig.11. Konidiofor med konidier av *Alternaria infectoria* (Westman, 2010).

Botrytis cinerea/ Botryotinia fuckeliana

Botryotinia fuckeliana är namnet på det sexuella stadiet av *Botrytis cinerea* som orsakar den vanliga sjukdomen gråmögel, vilken kan hittas över hela världen i de flesta ekonomiskt viktiga växter (Faretra *et al.*, 1988). Svampen angriper åkerböna och har symptom som liknar andra bladfläcksjukdomar (Kwon *et al.*, 2007). Svampen är en växtpatogen (Fukumari *et al.*, 2004). Den producerar grått mycel och långa, grenade konidioforer direkt på bladytan. Konidioforerna bär på gråa, encelliga och ovala konidier som är cirka 6 μm i diameter. Konidioforerna och konidierna bildar ett vindruvsklaseliknande mönster (Fig. 12). Konidierna släpps när det är fuktigt ute och de sprids med vinden. Svampen bildar ofta svarta, hårda, platta och oregelbundna sklerotier. På sklerotierna bildar *B. fuckeliana* apothecier där det utvecklas askosporer som sprids med vinden. Svampen övervintrar i jorden som mycel på växtrester eller som sklerotier. Den verkar inte infektera frön, men kan spridas med frön som bär på sklerotier eller infekterade växtrester. *B. fuckeliana* växer, förökas och sprids bäst vid en temperatur omkring 18-23 °C. Den kan orsaka stora förluster i grödor som lagras under en lång tid, till och med om temperaturen är 0-10 °C (Agrios, 2005). Forskningen som har gjorts på denna svamp avseende på om den är utsädesburen eller inte är mycket begränsad. Däremot är det känt att svampen ofta finns i det yttersta skalet på fröerna, vilket gör det möjligt att beta utsädet mot denna svamp (CABI, 2010).

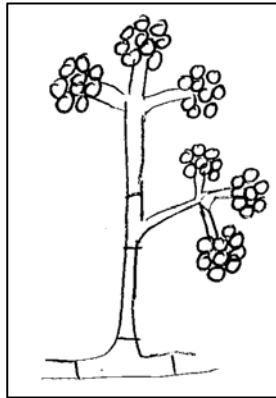


Fig. 12. Konidiofor med konidier av *Botrytis cinerea*, konidierna är 6 µm i diameter (Westman, 2010).

Metoder för att identifiera svampsamhällen

Ett sätt att identifiera de arter som ingår i svampsamhällen kan vara mikroskopering, för att se de unika strukturerna hos enskilda arter. Dessutom kan en renodling göras för att sedan identifiera svamparna med hjälp av molekylära metoder baserade på svampens DNA, till exempel terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). T-RFLP är en metod som kan användas för att studera mikrobiella samhällens dynamik och struktur, därför valdes denna metod för denna studie. Det krävs flera steg för att komma fram till ett specifikt mönster i DNA-strukturen hos till exempel en svamp. Metoden identifierar svamparter genom variation i fragmentstorlek efter klyvning av PCR-produkter med enzymer (Kitts 2001). Det område i svampens DNA som oftast används för artidentifiering är ITS-regionen (Internal transcribed spacer region) vilken i huvudsak är unik för varje svampart. För att kunna använda metoden behövs ett referensbibliotek med bestämda fragmentlängder från olika ITS-regioner för olika arter. För att få fram ett referensbibliotek renodlades svampar från bönorna och dessutom gjordes en kloning av PCR-produkterna från proverna med hjälp av en bakterie, som sedan sekvenseras. Därefter jämförs klippmönstret hos proverna med referensbiblioteket för att då kunna artbestämma svamparna (Lindahl *et al.*, 2007). Under kloningen användes bakterien *Escherichia coli* vilken odlades på plattor med LB-agar och X-gallösning som är specialiserad för detta. X-gal visar om bakterierna kan bryta ner betagalaktosidas, vilket är kopplat till en fungerande kloning. Om bakterierna har lyckats ta upp plasmiden (vektorn) med en ITS-region kan bakterierna bryta ner betagalaktosidas och blir vita medan de blå bakteriekolonierna inte kan göra det och där har inte heller kloningen lyckats.

Vid amplifiering av ITS-regionen används två primrar, ITS1-f och ITS4, där den förstnämnda har utvecklats specifikt för identifiering av svamparter. De två primrarna ger en amplifieringsprodukt av svamp-DNA som är 400-800 bp lång (Kitts, 2001). Vid T-RFLPn inmärks primrarna med de fluorescerande färgerna HEX och FAM för att topparna ska synas vid storleksanalys efter det att enzymer har klippt PCR-produkterna. Vid kloningen och sekvensering används omärkta primrar eftersom inmärkta primrar stör analysen av sekvenserna. Under DNA-extraktionen används CTAB, vars funktion är att sönderdela cellmembranen så att DNA blir tillgängligt.

EXPERIMENTELL DEL:

Material och metoder

Syftet med denna studie var att undersöka vilka svampar som kan finnas på åkerbönor efter skörd och om de har någon inverkan på böornas grobarhet. Åkerbönor från tio olika fält i Östergötland, samt fyra fält i Västergötland samlades in för att bestämma vilka svamparter som fanns på bönorna. Bönorna från Östergötland var skördade år 2009, utom fält 12 som var från skörd 2008. Bönorna från Västergötland skördades år 2006 och 2007. Prover som nämns i texten representerar slumpvis utvalda åkerbönor från de olika fälten.

Metoden som valdes till att identifiera vilka svampar som fanns på bönorna var T-RFLP. Denna metod går ut på att alla svampar har en specifik sekvens och fragmentlängd efter att PCR-produkter klippts med speciella enzymer. Först gjordes en DNA-extraktion på 336 bönor. Därefter genomfördes en PCR på alla prover och PCR-produkterna från svampens ITS-region klipptes med enzymer. DNA-fragmenten skickades sedan för storleksanalys och för att kunna identifiera topparna jämfördes de med ett referensbibliotek.

Ett referensbibliotek framställdes dels från renodlade isolat från bönor och dels från s.k. kloning (se nedan). Till referensbiblioteket renodlades svampar från åkerbönona och de amplifierade ITS-regionerna skickades på sekvensanalys till Macrogen Inc. i Sydkorea. Svamparterna identifierades sedan genom att sekvenserna jämfördes med referenssekvenser på GeneBank, the National Centre for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov). Varje svampart hade ett specifikt klippmönster, vilket gjorde det möjligt att jämföra topparna för referensbiblioteket med de 336 åkerbönprovernas toppar och på så sätt identifiera vilka svampar som fanns på åkerbönona.

För att få extra referensarter gjordes även en kloning. Klonerna sekvenserades på samma sätt som referensproverna och kunde sedan också användas i referensbiblioteket och då vid identifieringen av svamparna på åkerbönona.

Nedan följer en mer detaljerad metodbeskrivning. Recept och specificering av metoder återfinns i Appendix 1.

Grobarhetstest

Ett grobarhetstest genomfördes för att se om svamparna som infesterat bönona hade någon inverkan på deras grobarhet. Tvåhundra åkerbönor valdes slumpvis ut ur proverna från vart och ett av de 14 fälten. De lades därefter på fuktat filterpapper (10x50 cm). Femton bönor lades på varje papper som sedan rullades ihop, ställdes i en plastpåse och hölls fuktiga under den tid testet pågick (Fig. 13).



Fig. 13. Grobarhetstestet (Westman, 2010).

DNA-extraktion

Från varje prov togs 24 bönor ut slumpmässigt, vilket gav totalt 336 bönor. Bönorna lades en och en i små plastpåsar och krossades separat med en hammare, för att sedan stoppas i skruvlöcksrör som innehöll en skruv och två muttrar i rostfritt stål (M5). Ordningen i rören var: i botten en skruv med huvudet neråt, en mutter, därefter bönprovet och till sist en mutter igen. Proverna frystorkades över natt och krossades till ett fint mjöl genom att skakas i 5000 rpm under 30 sekunder (Precellys, Bertin Technologies). Tjugo milligram av det finmalda bönmjölet vägdes upp och lades i nya 1,5 ml rör tillsammans med fem glaskulor (\varnothing 3 mm). Extraheringsbuffert (800 μ l, 3 % CTAB) tillfördes och proverna skakades i 5500 rpm under 30 sekunder (Precellys, Bertin Technologies). Efter detta inkuberades proverna under en timme i värmeblock som var 65 °C och centrifugerades därefter i 13000 rpm under 5 minuter. Vätskan fördes över till nya 1,5 ml Eppendorfrör och 500 μ l kloroform tillsattes. Proverna omskakades och centrifugerades i 13000 rpm under 7 minuter. Den översta fasen överfördes till nya rör där 700 μ l isopropanol tillsattes. Proverna vändes några gånger och inkuberades i rumstemperatur under en timme för att sedan centrifugeras i 13000 rpm under 5 minuter. Vätskan hälldes av och 200 μ l 70 % etanol tillsattes för att tvätta DNA-pelleten och proverna centrifugerades i 13000 rpm under 2 minuter. Därefter lämnades proverna för att torka i cirka en timme för att sedan lösa upp DNAt i 70 μ l ddH₂O. För att undersöka koncentrationen av DNA i proverna användes en spektrofotometrisk metod eftersom DNA tar upp ljus av våglängderna 260-280 nm och mängden DNA motsvaras av mängden upptagen ljusstyrka (NanoDrop, Spectrophotometer, Thermo Scientific). Proverna blandades med en vortex innan provtagning. Proverna späddes slutligen till 1 ng DNA μ l⁻¹ prov och en slutvolym på 50 μ l.

Renodling av svampar till referensbibliotek

För att få fram fler arter till referensbiblioteket renodlades svampar från bönorna. Två åkerbönor valdes slumpvis ut från varje fält ut och lades på en agarplatta (halvstyrka PDA). Under renodlingen användes bönor från 14 fält. Efter synlig myceltillväxt ympades svamparna till nya plattor och detta fortsatte tills isolaten var renodlade. Mycel togs då från

varje isolat och lades i rör tillsammans med fem glaskulor (\varnothing 3 mm). Proverna frystorkades för att sedan skakas i 5500 rpm under 30 sekunder (Precellys, Bertin Technologies). Sedan utfördes DNA-extraktionen på samma sätt som tidigare nämnts och proverna späddes till samma koncentration som tidigare. Efter PCR-amplifiering klipptes produkterna med enzymer samtidigt som de andra proverna. Sekvenseringen utfördes sedan av Macrogen i Seoul, Sydkorea. Här användes primrarna omärkta ITS4 och ITS1f. Svamparna identifierades på samma sätt som klonerna (se nedan).

Kloning av svampar till referensbibliotek

Till kloning valdes först 96 prover ut av de sammanlagt 336 proverna. Detta gjordes med hjälp av tidigare elektroforesresultat som visade olika storlekar på produkterna. För att förbereda inför kloning kördes en PCR med omärkta ITS1-f- och ITS4-primrar och produkterna kontrollerades med hjälp av elektrofores som ovan. Bland de 96 proverna valdes 14 prover ut som slogs ihop till två eppendorfrör, 4 μ l av vardera 7 prover per rör. Rening och fällning gjordes enligt protokoll (Blixt *et al.*, 2010).

Efter kloningsstegen och odlingen på agarplattorna valdes 96 vita kloner ut och de blåa lämnades (se Appendix 1). Klonerna lades i en 96-brunnsplatta med 100 μ l ddH₂O och protokollet följdes vidare (Blixt *et al.*, 2010). Efter elektrofores valdes 64 prover med tydliga band ut för att renas enligt Agencourt® AMPure® protokollet 000601v024. Koncentrationen av PCR-produkterna kontrollerades (NanoDrop, Thermo Scientific) och de ställdes sedan på tork i ett torkskåp 37 °C. Sekvenseringen utfördes sedan av Macrogen i Seoul, Sydkorea. Svamparterna identifierades sedan genom att jämföra sekvenserna med referenssekvenser på the National Centre for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) och använda BLASTN algorithm med minst 98 % identitet. Med hjälp av SeqMan Genome Assembler (DNAStar Inc.) togs klippmönster ut för de tre använda enzymerna FastDigest® *AluI* (Fermentas), *CfoI* (Promega) och FastDigest® *TaqI* (Fermentas) för varje specifik svampart.

Identifiering av svamparter på åkerböror

Identifieringen av svamparna som fanns på åkerböror gjordes med hjälp av T-RFLP där svamparna har specifika klippmönster för enzymerna FastDigest® *AluI* (Fermentas), *CfoI* (Promega) och FastDigest® *TaqI* (Fermentas). Dessa kunde sedan jämföras med referensbiblioteket från renodling och kloning och kopplas till böror från de fjorton olika fälten. Till PCR-analysen användes primrarna ITS1-f och ITS4, inmärkta med fluorescenserna FAM respektive HEX vilket betyder att de absorberade ljus på olika våglängder och gav topparna olika färger. För att ta hänsyn till pipetteringsfel blandades en PCR-mix till 400 prover, som sedan användes till 375 prover med tio μ l av PCR-mixen och 10 μ l av DNA i vardera prov. För slutkoncentrationer och PCR-förhållanden se Appendix 1 och Blixt *et al.* (2010). PCR-produkterna separerades sedan på 1 % agaosegel vid 200 V i 25 minuter och undersöktes i UV-ljus. Fanns det produkter syntes dessa som band på gelen (GelDoc, Bio-Rad Laboratories).

PCR-produkterna klipptes sedan med hjälp av enzymerna FastDigest® *AluI* (Fermentas), *CfoI* (Promega) och FastDigest® *TaqI* (Fermentas) enligt protokoll (se Appendix 1 och Blixt *et al.*, 2010). För att få bort salter ur de klippta proverna gjordes en sephadexrening (se Appendix 1 och Blixt *et al.*, 2010). Innan reningen späddes de klippta proverna; 2 μ l prov och 18 μ l H₂O. Proverna skickades för storleksanalys till Uppsala Universitet, Institutionen för genetik och patologi (Uppsala Genome Center, www.genpat.uu.se). Proverna analyserades sedan med hjälp av GeneMarker (stege ROX 1000), där fragmenten inmärkta med FAM respektive HEX

avlästes som toppar. Topparna analyserades utifrån storleken på de klippta fragmenten och jämfördes sedan med klippmönstret från fragmenten från de renodlade svamparna och klonerna i referensbiblioteket.

Analys av resultat

För att undersöka hur svampsamhällena på åkerböborna från de olika fälten förhöll sig till varandra användes en multivariat metod kallad 'detrended correspondence analysis' (DCA) (Canoco version 4,5 för Windows (Microcomputer Power)). För att undersöka variationen i svamparternas förekomst på böborna mellan olika fält användes 'canonical correspondence analysis', CCA.

Resultat

Grobarhetstest

Efter sju dagar var större delen av böborna grodda och de hade då groddar som var lika långa som eller längre än bönan. Vissa bönor som inte hade grott hade tecken på mycelväxt. Resultat erhöles genom att räkna antal grodda bönor per fält. Grobarheten varierade mellan 88-99 % (Fig. 14).

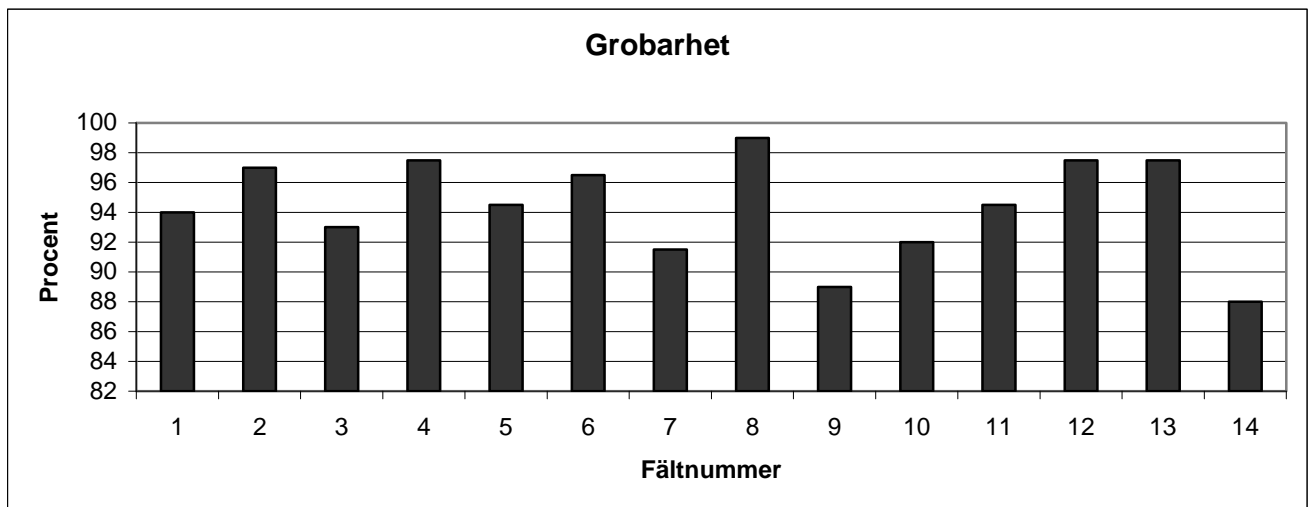


Fig. 14. Åkerböbornas grobarhet i procent från varje fält. N=200

Referensbibliotek

Sextiofem kloner sekvenserades och dessa grupperades i 53 olika grupper (kluster) med hjälp av SeqMan Genome Assembler med en noggrannhet på 98 %. Tjugo av grupperna identifierades som *Ascochyta* sp. och två som *Cladosporium* sp. och båda dessa var till 98-100 % identiska med referenssekvenserna på NCBI. Resterande kloner var oidentifierbara på grund av för låg identitetsgrad i förhållande till referenssekvenserna på NCBI.

Renodlingen resulterade i många olika svampar. Mycelen var gula, vita, röda, gröna, vissa var luftiga och i andra hade det bildats sklerotier. Det blev slutligen fjorton olika arter när de

Tabell 2. Fördelning av identifierade svamparter efter renodling av svamp på åkerböna.

Saprofyt	Patogen	Jästsvamp
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Ascochyta fabae</i>	<i>Chaetomium</i> sp.
<i>Hypocrea viridescens</i>	<i>Alternaria infectoria</i>	
<i>Arthrinum arundinis</i>	<i>Borytis cinerea</i>	
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>	
<i>Ascochyta</i> sp.		
<i>Mucor circinelloides</i>		
<i>Fusarium</i> sp.		
<i>Lichtheimia corymbifera</i>		
<i>Cladosporium</i> sp.		

identifierades med hjälp av NCBI och de grupperades som saprofyter, patogener eller jästsvampar (Tabell 2). Vissa arter hittades i flera av fälten till exempel *Penicillium aurantiogriseum*, medan några endast hittades i ett fält (Tabell 3).

Identifiering av svamparter på åkerbönor

När T-RFLP-fragmenten jämfördes med referensbiblioteket kunde flera svamparter identifieras bland åkerbönona. Av de fjorton arterna som fanns med i referensbiblioteket hittades tio stycken av dessa på de malda bönona. De svampar som endast fanns med vid renodlingen och kloningen var *Mucor circinelloides*, *Lichtheimia corymbifera*, *Alternaria* sp. och *Fusarium* sp. Klippmönstret från dessa kunde inte hittas i proverna från T-RFLP-resultaten. Av de 24 bönona per fält bar vissa på en svampart medan andra bar på flera arter (Tabell 3). Både antalet arter och artsammansättningen varierade mellan de olika fälten. Ett fåtal T-RFLP-fragment kunde inte kopplas till en specifik svampart.

Tabell 3. Förteckning av identifierade svamparter på åkerbönor utifrån hur arterna identifierats efter renodling och/eller T-RFLP samt grobarheten i resp. fältprov.

	Identifierad art	Renodl.	T-RFLP	Grobarhet (%)		Identifierad art	Renodl.	T-RFLP	Grobarhet (%)	
Fält 1	<i>Botrytis cinerea</i>	1	0	94	Fält 9	<i>Cladosporium</i> sp.	1	0	89	
	<i>Alternaria</i> sp.	1	0			<i>Lichtheimia</i>	1	0		
	<i>Fusarium</i> sp.	1	0			<i>corymbifera</i>				
	<i>Penicillium</i>	0	3			<i>Ascochyta</i> sp.	0	2		
	<i>aurantigriseum</i>					<i>Ascochyta Fabae</i>	0	2		
Fält 2	<i>Ascochyta</i> sp.	0	2	97	<i>Phoma exigua</i> var.	0	2			
	<i>Phoma exigua</i> var.	0	2		<i>exigua</i>					
	<i>exigua</i>				<i>Penicillium</i>	0	3			
	<i>Penicillium</i>	0	4		<i>aurantigriseum</i>					
	<i>aurantigriseum</i>				<i>Chaetomium</i> sp.	0	1			
Fält 3	<i>Chaetomium</i> sp.	0	1	93	Fält 10	<i>Ascochyta</i> sp.	0	4	92	
	<i>Phoma exigua</i> var.	1	0			<i>Ascochyta Fabae</i>	0	4		
	<i>exigua</i>					<i>Botrytis cinerea</i>	0	4		
	<i>Ascochyta Fabae</i>	1	0			<i>Phoma exigua</i> var.	0	4		
	<i>Botrytis cinerea</i>	0	2			<i>exigua</i>				
Fält 4	<i>Penicillium</i>	0	5	97,5	<i>Penicillium</i>	0	4			
	<i>aurantigriseum</i>				<i>aurantigriseum</i>					
	<i>Chaetomium</i> sp.	0	1		<i>Chaetomium</i> sp.	0	2			
	<i>Hypocrea</i>	1	0		Fält 11	<i>Ascochyta</i> sp.	0		1	94,5
	<i>viridescens</i>					<i>Ascochyta Fabae</i>	0		1	
<i>Ascochyta Fabae</i>	0	3	<i>Phoma exigua</i> var.	0		1				
<i>Botrytis cinerea</i>	0	1	<i>exigua</i>							
<i>Cladosporium</i> sp.	0	1	<i>Penicillium</i>	0		2				
Fält 5	<i>Arthrimum</i>	0	2	94,5	<i>aurantigriseum</i>					
	<i>aurundinis</i>				Fält 12	<i>Ascochyta</i> sp.	0		1	97,5
	<i>Penicillium</i>	0	9			<i>Ascochyta Fabae</i>	0		1	
	<i>aurantigriseum</i>					<i>Cladosporium</i> sp.	0		1	
	<i>Chaetomium</i> sp.	0	2			<i>Phoma exigua</i> var.	0		1	
<i>Ascochyta</i> sp.	1	0	96,5	<i>exigua</i>						
<i>Ascochyta Fabae</i>	1	0		<i>Penicillium</i>	0	2				
<i>Fusarium</i> sp.	1	0		<i>aurantigriseum</i>						
<i>Hypocrea</i>	1	0		<i>Chaetomium</i> sp.	0	3				
<i>viridescens</i>				Fält 13	<i>Phoma exigua</i> var.	1	0	97,5		
<i>Botrytis cinerea</i>	0	1	<i>exigua</i>							
<i>Penicillium</i>	0	1	<i>Ascochyta Fabae</i>		1	2				
<i>aurantigriseum</i>			<i>Arthrimum</i>		1	0				
<i>Penicillium</i>	0	1	<i>aurundinis</i>							
Fält 6	<i>aurantigriseum</i>			<i>Botrytis cinerea</i>	1	2				
	<i>Chaetomium</i> sp.	0	1	<i>Penicillium</i>	0					
	<i>Phoma exigua</i> var.	1	5	<i>aurantigriseum</i>						
	<i>exigua</i>			Fält 14	<i>Mucor</i> sp.	1		0	88	
	<i>Ascochyta Fabae</i>	1	6		<i>Ascochyta Fabae</i>	1		8		
<i>Penicillium</i>	1	8	<i>Ascochyta</i> sp.		0	7				
<i>aurantigriseum</i>			<i>Phoma exigua</i> var.		0	7				
<i>Hypocrea</i>	1	0	<i>exigua</i>							
<i>viridescens</i>			<i>Arthrimum</i>	0	3					
<i>Alternaria</i> sp.	1	0	<i>aurundinis</i>							
<i>Alternaria</i>	1	0	<i>Hypocrea</i>	0	1					
<i>infectoria</i>			<i>viridescens</i>							
<i>Ascochyta</i> sp.	0	9	<i>Penicillium</i>	0	1					
<i>Chaetomium</i> sp.	0	2	<i>aurantigriseum</i>							
Fält 7	<i>Chaetomium</i> sp.	1	3	99	<i>Chaetomium</i> sp.	0	3			
	<i>Penicillium</i>	1	11		<i>Alternaria</i>	0	1			
	<i>aurantigriseum</i>				<i>infectoria</i>					
	<i>Ascochyta Fabae</i>	0	3							

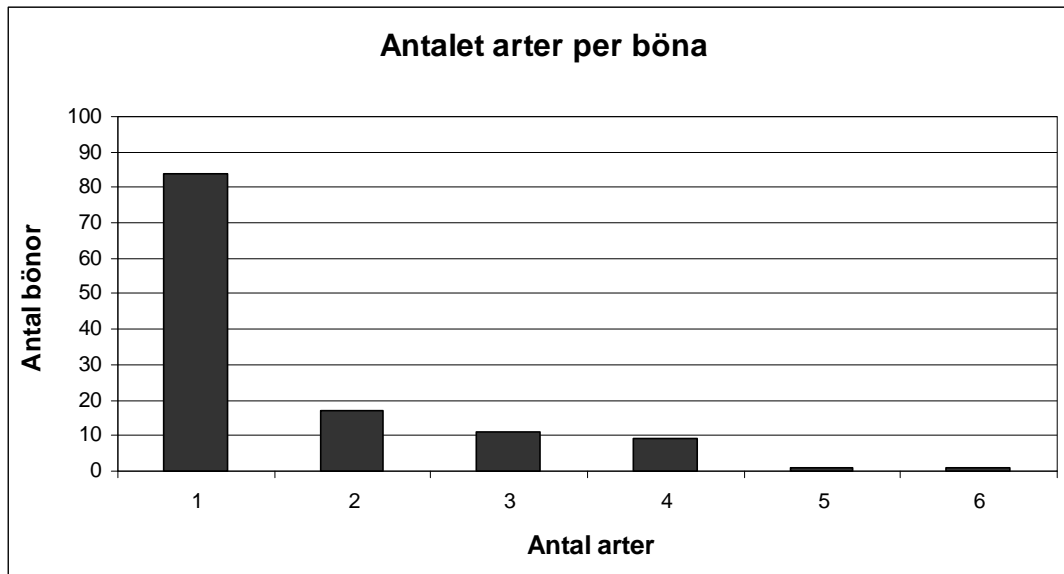


Fig. 15. Antalet svamparter identifierade på varje enskild böna i skördeprover från 14 fält, N = 123.

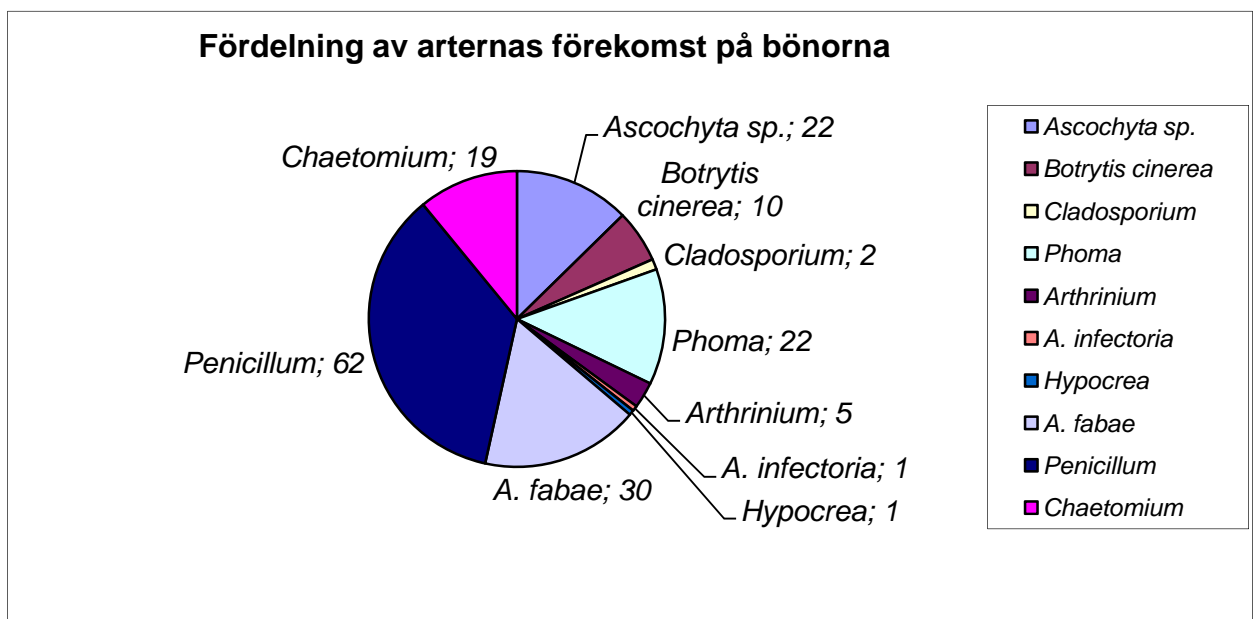


Fig. 16. Fördelning av svamparter som identifierades på åkerbönorna. Flera arter kunde förekomma på en enskild böna, N = 123.

Antalet identifierade arter på åkerbönorna varierade från noll till sex arter på den böna som bar på flest arter (Fig. 15). På en böna fanns fem arter. Sammanlagt 123 bönor bar på någon svamp och på resterande 213 bönor kunde ingen svamp identifieras. *Penicillium aurantiogriseum* var den svamp som fanns i alla fält och i högst frekvens. Det fanns mycket *Ascochyta* på bönorna som kunde identifieras till *A. fabae* eller bara till genusnivå. Ett annat släkte det fanns mycket av var jästsvampen *Chaetomium* sp. Dessutom kunde *Phoma exigua* var. *exigua* identifieras i flera prov (Fig. 16).

Analys av svampsamhällen i åkerböna

För att analysera resultaten i denna studie användes olika statistiska metoder. Analyserna skulle visa om artfördelningen på börnorna varierade mellan fält, samt om arternas förekomst på börnorna varierade.

Analysen gjord med hjälp av metoden detrended correspondence analysis (DCA) (Canoco version 4,5 för Windows (Microcomputer Power) visade att artfördelningen på börnorna varierade inom och mellan fält vilket illustreras med olika färger och symboler i Fig. 17. Vissa symboler överlappar varandra då svampsamhällena var lika varandra på flera fält. Överlappningarna finns i fält: 12 och 14, 9 och 10, 12 och 13, 12 och 14, 10 och 14 samt 3, 5 och 13. Symboler (fält) som ligger nära varandra har liknade artsammansättning. Ett prov togs bort då detta prov var det enda som bar på *Hypocrea viridescens* och då störde de andra resultaten.

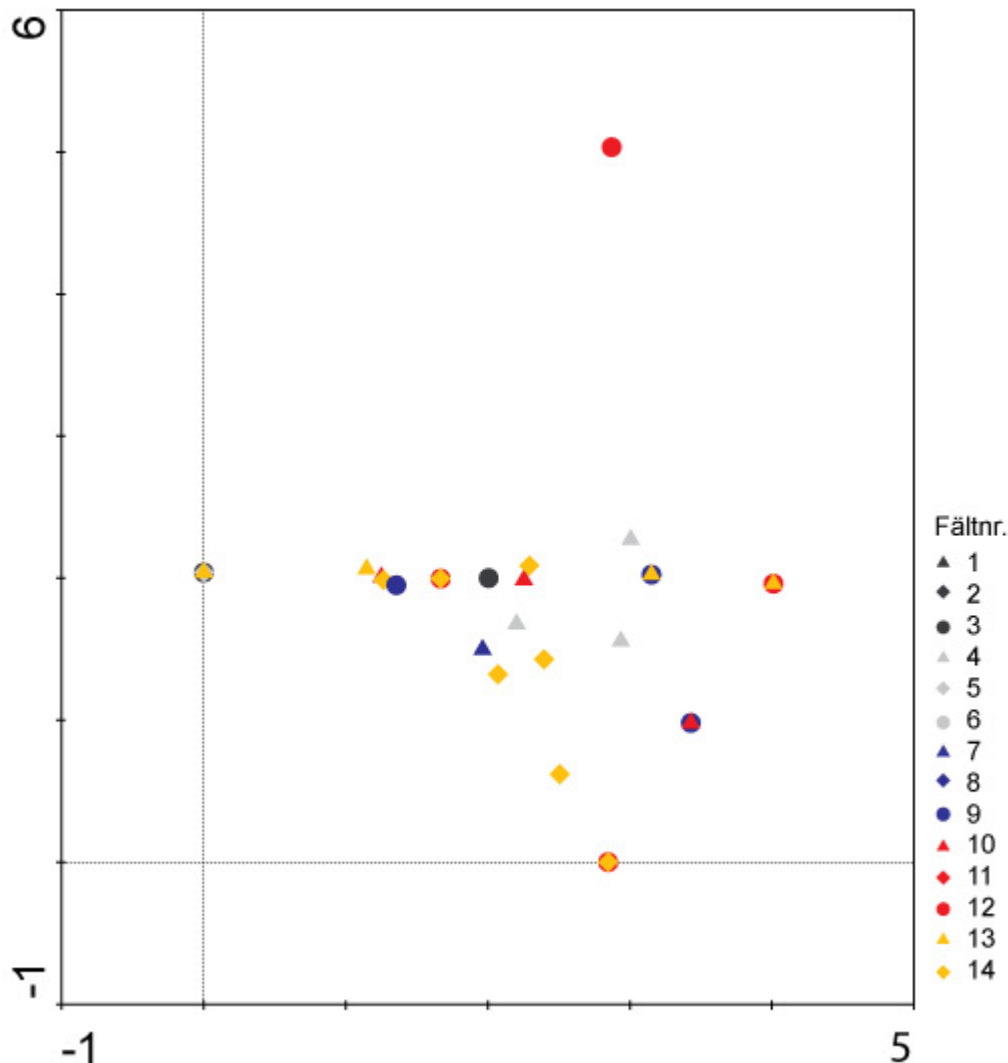


Fig. 17. Spatiell sammansättning och variation av svampsamhällen hos åkerbönor från 14 olika fält baserat på en 'detrended correspondence analysis' (DCA).

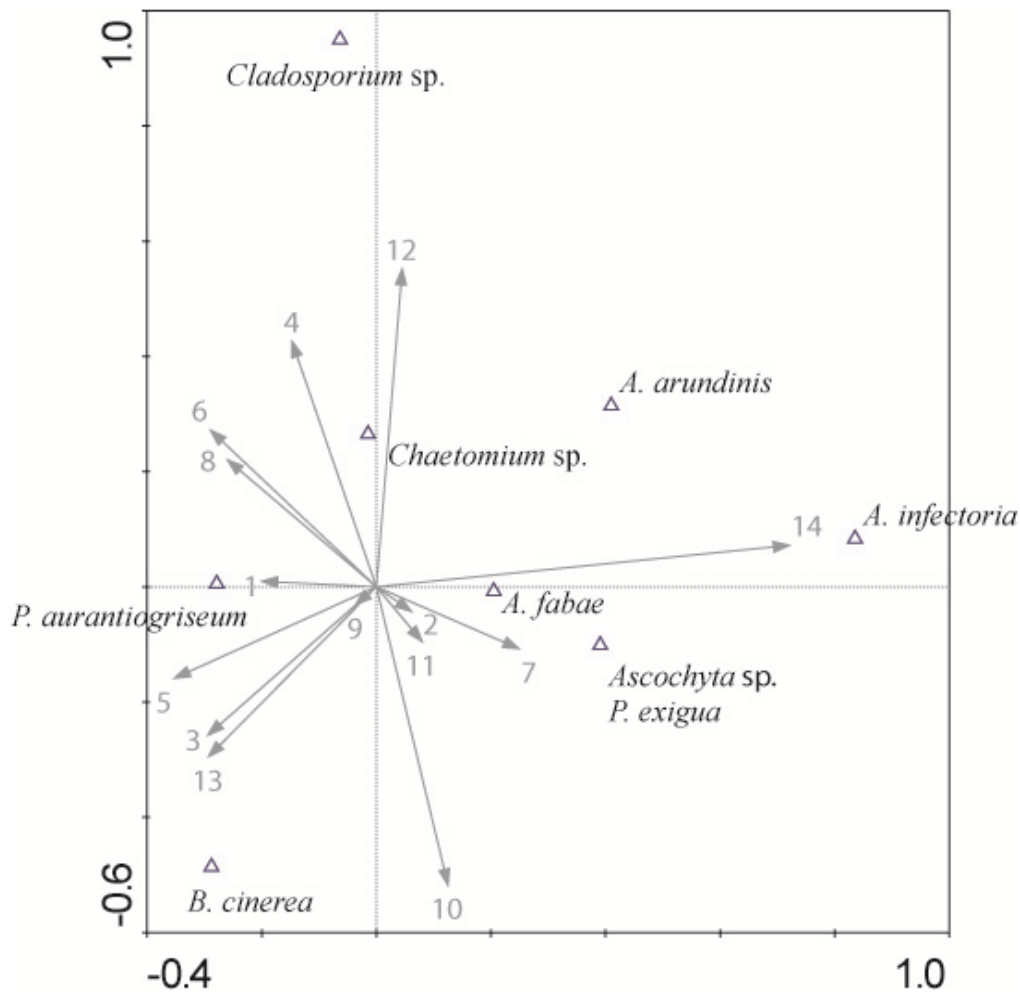


Fig. 18. Spatiell fördelning av svampsamhället i varje enskilt fält utifrån artsammansättningen i de olika fälten analyserad med 'canonical correspondence analysis', CCA.

För att undersöka variationen i svamparternas förekomst på börnorna mellan olika fält användes 'canonical correspondence analysis', CCA (Fig. 18). Denna visade att artvariationen till 20,3 % kan förklaras av variationen mellan fälten, vilket också verifierades med ett Monte Carlo-test med 1000 permuteringar ($P = 0,0020^{**}$). Pilarna i figuren illustrerar vilka svamparter som åkerbörnorna från de olika fälten hade mest av; längre pilar indikerar fler bönor med samma svampart. Siffrorna anger fältnumren. Ju närmare origo de olika arterna ligger, desto vanligare var det att de fanns på börnorna. Till exempel fanns det få fält med *Cladosporium* sp. men mest av den fanns i fält 4 och 12.

Diskussion

Med hjälp av T-RFLP kunde flera olika svamparter identifieras på åkerböborna, bland annat en av de vanligaste utsädesburna patogenerna på åkerböna, *Ascochyta fabae* (teleomorf *Didymella fabae*) som orsakar bönläcksjuka. De partier från fält som hade mycket *A. fabae* bör därför inte användas som utsäde. Klonerna som identifierades till släktet *Aschochyta* kunde inte identifieras närmare än till *Ascochyta* sp. med hjälp av T-RFLP då *Ascochyta pisi* var. *pisi*, *A. viciae-villoseae* och *A. viciae-pannonicae* inte kunde särskiljas i BLASTN samt att restriktionsenzymerna klippte på samma ställen i ITS-sekvensen. Klippmönstret för *A. fabae* skiljde sig från de övriga *Ascochyta*-arterna som hittades, vilket gjorde att det var möjligt att artbestämma denna. I Sverige anses dock inte *A. fabae* vara ett stort problem idag; många får normala skördar trots angrepp av denna svamp. *Botrytis fabae* som orsakar chokladläcksjuka kan i ett tidigt stadium var svår att skilja från angrepp av *A. fabae* då symptomen är mycket lika i fält. Det är endast vid extremfall vid konventionell odling som svampsjukdomar bekämpas med fungicider och det fungerar fortfarande bra att odla åkerbönor ekologiskt. Flera av svamparterna som är vanliga på åkerböna kunde identifieras (Tabell 1).

Den enda utsädesburna svampen som hittades i denna studie som orsakar sjukdom på åkerböna var *A. fabae* som orsakar bönläcksjuka. Denna svamp hittas mest i fröskalet, men kan finnas längre in i fröerna. Detta gör att det kan vara möjligt att beta utsädet (CABI, 2010). *B. fabae* som orsakar chokladläcksjuka på åkerböna, hittades inte. Detta kan bero på att svampen inte är utsädesburen. Dock kan den hittas på fröerna, men oftast utan att sjukdom utvecklas från dessa (CABI, 2010). I stället sprids *B. fabae* med smittade växtrester och från intilliggande fält. Det går heller inte att säga om det fanns någon *Peronospora viciae* som orsakar bönläcksjuka på böborna, då detta är en oomycet vilken inte amplificeras med ITS1-f. *P. viciae* kan spridas med utsäde, men inga undersökningar har visat att smittan går vidare till grodden. Detta betyder att det är jordsmitta som är den viktigaste inokulumkällan för den patogenen. Andra patogener som hittades i denna studie var *Botrytis cinera* och *Alternaria infectoria*.

En av svamparna som hittades var *Hypocrea viridescens* vilket är namnet på det sexuella stadiet av *Trichoderma viridescens*. Det är en vanlig jordlevande svamp som går att hitta i större delen av världen, men den största genetiska variationen finns i Europa och Nordamerika. *Trichoderma*-arter kan till exempel fungera som nedbrytare i jorden, de kan användas för biologisk kontroll av andra sjukdomsintroducerande svampar och nematoder då de kan tillverka sekundära metaboliter och enzymer och de kan hjälpa växter att lättare ta upp fosfor (Jaklitsch *et al.*, 2006). Svampen följer sin värdväxt tills den ruttnar och kan leva på den som en sekundär kolonisatör (Kubicek *et al.*, 2008).

En annan art som hittades var *Arthrinium arundinis* som bland annat kan orsaka sjukdom på korn och infektera många andra växter. Svampen är en jordlevande saprofyt och finns överallt, men speciellt där det odlas korn (Nyvall, 1999). Åkerböna är ingen värdväxt för denna svamp. *Phoma* sp. hittades också under denna studie. Även denna kontaminerar ytan på fröerna. En del *Phoma*-arter orsakar stora problem inom grönsaksodling och hos andra ettåriga växter (Agrios, 2005). I Afrika och i västra Europa orsakar *Phoma* sp. symptom på bönor som liknar dem för bönläcksjuka (CIAT, 1998).

Som tidigare nämnts hittades *Penicillium aurantiogriseum* som är den vanligaste av alla *Penicillium*-arter och som kan påträffas på spannmål världen över (Lund *et al.*, 1994).

Penicillium-arter orsakar gråmögel och grönmögel, vilka hör till de allra vanligaste sjukdomarna som uppkommer efter skörd. Den kan uppkomma på de flesta växter och grönsaker. *Penicillium* sp. går in i vävnad genom skador eller sprider sig från infekterad frukt som ligger intill frisk frukt. Svampen producerar olika mykotoxiner, såsom patulin (Agrios, 2005). Denna saprofytt går att hitta på de flesta grödorna världen över.

Detsamma gäller för *Fusarium* sp. som också är en av de vanligaste svamparna på spannmålsgrödor. Inom släktet *Fusarium* finns många jordlevande nekrotrofa växtpatogener, vilket betyder att de lever av dött växtmaterial samtidigt som de är kapabla till att infektera friskt växtmaterial. Många *Fusarium*-arter orsakar svåra sjukdomar på växter globalt, till exempel rötter och vissnesjukdomar. Flera *Fusarium*-arter är förknippade med att de producerar mykotoxiner som kan vara farliga för djur och människor. Dessa arter överlever som mycel eller sporer om det inte finns någon värdväxt närvarande. *Fusarium* sp. kontaminerar ofta grödan innan eller under skörd och utvecklas sedan i fältet eller under lagring. Störst skada kan de göra i grödor som lagras länge såsom potatis (Agrios, 2005). Anledningen till att *Fusarium* sp. placerades som en saprofytt i denna studie är att den inte antas vara en patogen på åkerböna.

Under renodlingen hittades även saprofyten *Mucor* sp. Svampen påverkar frukt och grönsaker vilket gör att de möglar efter skörd. Dessutom kan den kontaminera baljväxter och annan spannmål när de lagras, men endast på fröernas yta, speciellt om det är fuktigt (Agrios, 2005). Åkerböornas lagring är antagligen orsaken till kontamination av denna svamp.

Många svåra och viktiga sjukdomar orsakas av svampar inom släktet *Cladosporium*, som till exempel orsakar bladmögel på tomat. I detta fall anses denna svamp vara en saprofytt då den inte orsakar sjukdom på åkerböna. *Cladosporium* är en mitosporssvamp, vilket betyder att den inte har något sexuellt stadium. Svampen bildar mörka, långa och upprätta konidioforer som kan förgrena sig i toppen. Konidierna är ovala, mörka och kan bestå av en till tre celler. Dessa gör att svampen ser svart ut. Konidierna sprids med vatten och med vind och svampen övervintrar som mycel eller konidier i växtrester (Agrios, 2005).

Den sista svampen som hittades var *Lichtheimia corymbifera* (syn. *Absidia corymbifera*). Den är en saprofytt, spridd över hela världen, som lever i döda växtrester eller i jorden (Alastruey-Izquierdo, 2010). Den är också känd för att orsaka sjukdom hos människor och djur. Hos kor kan den orsaka mastit och spontan abort vilket kan bli ett problem om odlare ger sina kor foder som innehåller mycket av denna svamp (Piancastelli *et.al.*, 2009).

Det enda genus av jästsvamp som hittades under studien var *Chaetomium*. Det är ett släkte av jordlevande jästsvampar och mer än 180 arter har upptäckts hittills. De flesta arterna bryter ner cellulosa i till exempel fröer, trä och komponenter i jorden. Svampen behöver cellulosarika substrat för att kunna sporulera. Den orsakar allergi hos människan (Aru *et. al.*, 1996). Avsaknaden av fler jästsvampar kan bero på att under renodlingen togs i största möjliga mån endast mycel och resten lämnades.

Av de 336 börnorna som ingick i studien, 24 stycken från varje fält, kunde minst en svampart identifieras på 123 bönor, vilket motsvarar en kontaminationsgrad på ca 30 %. Fält nummer 1-10 låg i Östergötland och fält nummer 11-14 i Västergötland. Det gick inte att se någon geografisk skillnad mellan Östergötland och Västergötland eftersom alla påträffade arter fanns i båda landskapen vid renodling och på de malda börnorna. De multivariata analyserna visade dock att svampsamhällena i proverna från de olika fälten skiljer sig åt. En

förklaringsgrad på 20,3 % är en relativt hög siffra i detta sammanhang, vilket betyder att det fanns en skillnad i svampartförekomst mellan fälten. Detta kan bero på vilken förfrukt som odlats och att de olika sorterna har varierande mottaglighet för svampkontamination. Om åkerbönor odlats i närheten tidigare år är risken större att det finns svamp kvar som kan infektera igen. Andra faktorer som kan påverka svampsamhället kan vara jordbearbetning då många svampsjukdomar kan minskas med plöjning. Många svamparter är beroende av vatten vilket gör att vattentillgången är viktig, dessutom betyder näringstillståndet mycket för åkerböna. Friska plantor klarar infektioner bättre. Lantbrukarna kan också ha använt sig av olika bekämpningsmedel under säsongen vilket bidragit till skillnaderna i fälten.

Grobarheten varierade mellan 88-99%, vilket är relativt liten variation. Vid jämförelse av svampförekomsten på bönorna och deras grobarhet visade det sig att bönorna från fältet med flest identifierade arter också hade lägst grobarhet, 88 %. Detta betyder sannolikt att svampförekomsten inverkar på grobarheten, dock går det inte att säga om det är en specifik art som bidrar mest eller om det är ett samspel mellan flera arter. Fältet med lägst grobarhet hade mest *Ascochyta fabae* och *Ascochyta* sp. av alla fält, vilket kan vara en bidragande faktor. En annan möjlig orsak är att det är antalet olika svamparter som inverkar på grobarheten.

Alla svamparter som identifierades efter renodlingen kunde inte hittas med T-RFLP. Det kan bero på att endast 20 mg slumpmässigt vägdes upp av varje mald böna. Detta har troligen medfört att inte alla svampar på bönorna följt med i studien. Hela bönan kunde heller inte användas eftersom DNA-extraktionen inte gick att fullfölja på grund av för mycket orenheter och växtpartiklar. Detta visar att det är viktigt att isolera och identifiera svampar med en annan metod parallellt med T-RFLP för att få med så många svamparter som möjligt. De två fälten som togs bort under metodutvecklingen, men som användes vid renodlingen, kan också haft svampar som sedan inte kom med i T-RFLP.

Vissa kloner gick inte att identifiera under studien då det inte fanns några matchande referenskloner på NCBI. Detta kan bero på att det hittills inte har gjorts mycket forskning kring svampsamhällen i åkerböna och detta leder till att många svampar inte är identifierade och finns därmed inte med i referensregistret. Detta förklarar varför några toppar från T-RFLP inte kunde kopplas ihop med en identifierad art. Detta betyder att fler studier såsom denna behöver göras på just åkerböna för att få fram fler svamparter till referensbiblioteket.

Kunskapen om fröburna patogener på åkerböna är begränsad, vilket leder till att det är svårt för lantbrukare och rådgivare att veta vilka sjukdomar som kan uppkomma i fält. På grund av detta behövs mer forskning eftersom odlingen av åkerbönor ökar både i Sverige och i övriga delar av världen.

SLUTSATSER

Då det har gjorts väldigt lite forskning rörande åkerböna, var detta projekt ett steg i rätt riktning. Detta kan vara den första studien som visar vilka svampar som kan finnas på skördade åkerböner i Sverige. Mer forskning kring åkerböner behövs, speciellt om odlingen av åkerböna ökar. Då kommer säkerligen angrepp av svampar och andra skadegörare att öka vilket kan göra odlingen mer problematisk. Då är det viktigt att veta vilka svampar som kan förekomma och sedan kunna göra något åt dem.

I denna studie identifierades 14 olika svamparter, varav fyra var patogener, nio stycken räknades som saprofyter och en jästsvamp. Det gick inte att påvisa någon regional skillnad mellan Östergötland och Västergötland, men det fanns en stark fältvariation vad gäller svampförekomst och artsammansättning.

Grobarheten tycks bli sämre vid riklig svampförekomst, vilket inte är bra om bönorna ska användas som utsäde. Vissa svampar är inte önskvärda då de kan ge upphov till sjukdomar hos djur. I vissa fält förekom mycket *Ascochyta fabae* och *Botrytis cinerea*, vilka är växtpatogener och inte önskade på ett utsäde då dessa två kan orsaka allvarliga sjukdomar på åkerböna och sjukdomarna kan spridas till nya fält. *Botrytis fabae* som orsakar chokladfläcksjuka hittades inte i denna studie, vilket kan förklaras av att den svampen inte räknas som utsädesburen.

T-RFLP är en bra metod att använda för identifiering av svampsamhällen vid denna typ av forskning. En nackdel är dock att primern ITS1-f inte amplifierar oomyceter. En oomycet som orsakar en av de vanligaste och mest problemgivande sjukdomarna på åkerböna är *Peronospora viciae*, som orsakar bönbladmögel. Ett annat problem kan vara att svamparter har likartade sekvenser och klippmönster vilket kan göra att svampar förbises. Detta visar att det är viktigt att kombinera flera metoder för att få bästa resultat, eftersom den största svårigheten är att skapa ett referensbibliotek till T-RFLP.

ÅKERBÖNODLINGENS FRAMTID

Diskussionen om sojabönans användande är viktig i samband med diskussionen om åkerbönans framtid. Soja är ett utmärkt proteinfoder, men odlingarna i Sydamerika och Nordamerika innebär en stor miljöbelastning då bekämpningsmedel som länge varit förbjudna i Europa används samt att regnskogar skövlas (Sp Sveriges Tekniska forskningsinstitut, 2010). Bekämpningsmedlen ger skador på både människor och djur. Priset på soja och annat proteinfoder har också stor betydelse. Om den stora sojaimporten till ett lågt pris gör att svenska lantbrukare inte är lika betalningsvilliga för de svenska proteingrödorna, bör sojaimporten minska för att få igång den svenska produktionen. Växtförädlingen av åkerbönor kommer förhoppningsvis att tas upp igen och komma till Norden när åkerbönan återigen börjar bli populär att odla. Förbättrade sorter som är tidiga och innehåller mycket lättillgängligt protein av hög kvalitet är önskvärt. Det ska påbörjas tester där åkerbönor värmebehandlas för att omvandla proteinet till att bli mer lättillgängligt för djuren. Detta skulle kunna ge ett mindre behov av soja, då en värmebehandling skulle göra proteinet i åkerböna lika lösligt som i soja.

Om lantbrukarna odlar en proteingroda vart tredje år i växtföljden skulle en potentiell areal på 175 000 ha ärter och åkerbönor gå att uppnå. Den maximala arealen som odlats de senaste 20 åren är 60 000 ha. Vid en ungefärlig avkastning på 3,5 ton ha⁻¹ skulle skörden ge 612 000 ton vilket mycket väl skulle kunna räcka till självförsörjning av proteinfoder tillsammans med andra tillägg, exempelvis vall (Ulrik Lovang, Lovanggruppen, personlig kommunikation). Dock ska det tas i beaktning att om odlingen skulle öka så mycket, skulle antagligen förekomsten och angreppen av patogener och skadedjur också öka.

Många lantbrukare odlar sina åkerbönor ekologiskt. Ogräsharvning och radhackning fungerar bra då plantorna är tåliga och svampsjukdomarna är ofta inte ett så stort problem. Vissa konventionella odlare använder sig också av ogräsharvning, men kan till exempel behandla med herbicider innan uppkomst samt behandla med fungicider vid begynnande blomning eller 10-14 dagar senare. En sen behandling med fungicid mot svampsjukdomar kan försena mognaden vilket inte är önskvärt i en gröda som åkerböna som vanligtvis mognar sent på säsongen. Det finns få registrerade bekämpningsmedel mot svampsjukdomar i åkerböna och mer kunskap behövs inom området. Utvecklingen av biologiska bekämpningsmetoder är också något som behöver förstärkas för att få ett mer hållbart odlingssystem, främst i de ekologiska odlingarna men också i de konventionella.

Vissa år kan det vara svårt att så en höstgröda efter åkerböna, då skörden kan bli så sen att det är svårt att hinna med sådd. Då är en efterföljande vårgroda alternativet. Tillskottet av kväve som åkerböna bidrar till via kvävefixeringen tillgodoses dock bäst av en höstgröda.

LITTERATURFÖRTECKNING

Agrios G. N. (2005). *Plant Pathology*. Femte upplagan. Elsevier Academic Press Publications, San Diego.

Alastruey-Izquierdo A., Hoffman K., Sybren de Hoog G., Rodriguez-Tudela J. L., Voigt K., Bibashi E. & Walther G. (2010). Species recognition and clinical relevance of the zygomycetous genus *Lichtheimia* (syn. *Absidia* p.p., *Mycocladius*). *Journal of Clinical Microbiology* 48:2154-2170.

Aru A., Munk-Nielsen L. & Federspiel B. H. (1996). The soil fungus *Chaetomium* in the human paranasal sinuses. Denmark, *European Archives of Otorhinolaryngol* 254:350-2.

Blixt E., Olsson Å., Lindahl B., Djurle A. & Yuen J. (2010). Spatiotemporal variation in the fungal community associated with wheat leaves showing symptoms similar to stagonospora nodorum blotch. *European Journal of Plant Pathology* 126:373-386.

Boström U. (2004). Åkerböna eller lupin ett alternativ till ärtor?. Forskningsnytt om økologiskt lanbruk i Norden nr 4 december, sid. 12-13.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). (1998). *Bean Production Problems in the Tropics*. International Development Research Centre, Canada, sid. 234.

Djurle A. (2006). Sjukdomar i åkerböna, Ingår i Regional växtodlings- och växtskyddskonferens. Uddevalla 12-13 januari, SLU, Inst. för markvetenskap, 3 sid..

Faretra F., Antonacci E. & Pollastro S. (1988). Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia Fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology* 134: 2543-2550.

Fogelfors H. (Red.) (2001). *Växtproduktion i jordbruket*. Natur och Kultur/LTs förlag, Borås, sid. 157-163.

Fukumari Y., Nakajima M. & Akutsu K. (2004). Microconidia act the role as spermantia in the sexual reproduction of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology* 70:256-260.

Gunnarsson A. (1987). Bladmögel (*Peronospora viciae*), Chokladfläcksjuka (*Botrytis fabae*) och bönläcksjuka (*Ascochyta fabae*) på åkerböna (*Vicia faba*). SLU, Inst. För växt- och skogsskydd, Examensarbeten 1987:9.

Harrison J. G. (1978). Role of seed – borne infection in epidemiology of *Botrytis fabae* on filed beans. *Transactions of the British Mycological Society* 70: 35-40.

Hill J. (2005). Åkerböna kräver plöjning. *Jordbitten*, Länsstyrelsen Västra Götaland, Nr 3, sid. 16-17.

Holstmark K. (2007). *Ekologisk odling av åkerböna*. Jordbruksinformation 10. Jordbruksverket, sid 2-4.

- Jaklitsch W. M., Samuels G. J., Dodd S. L., Lu B.-S. & Druzhinina I. S. (2006). *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies in Mycology* 56: 135-177.
- Jellis G.J. & Punithalingam E. (1991). Discovery of *Didymella fabae* sp. nov., the teleomorph of *Ascochyta fabae*, on faba bean straw. *Plant Pathology* 40: 150-157.
- Johansson U. (1999). *Ärter och annan trindsäd*. Jordbruksinformation 7. Jordbruksverket, Sverige och EU.sid. 31-38.
- Kaiser W.J. (1997). Inter- and intranational spread of ascochyta pathogens of chickpea, faba bean and lentil. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19: 215-224.
- Kitts C.L. (2001). Terminal Restriction Fragment Patterns: A tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 2: 17-25.
- Kubicek C.P., Komon-Zelazowska M., Druzhinina I.S. (2008) Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *Journal of Zhejiang University Science* 9: 753–763.
- Kwon J.H., Jee H. J., Shen S. S. & Chae Y. S. (2007). Phytophthora rot of broad bean (*Vicia faba*) caused by *Phytophthora nicotianae* in Korea, *The Plant Pathology Journal* 23: 31-33.
- Lerenius C. (2007). Svampbekämpning i åkerböna. *Försöksrapport 2006 för mellansvenska försökssamarbetet* sid. 206-207.
- Lindahl B, Ihrmark K., Boberg J., Trumbore S. E., Högberg P., Stenlid J. & Finlay R. D. (2007). Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. *New Phytologist*, 173: 611-620.
- Lindén B. (2008). Efterverkan av olika förfrukter: inverkan på stråsädesgrödors avkastning och kvävetillgång – en litteraturöversikt. Rapport 14, Avdelningen för precisionsodling, SLU Skara, 66 sid.
- Lund F. & Frisvad J. C. (1994). Chemotaxonomy of *Penicillium aurantiogriseum* and related species. *Mycological Research* 98: 481-492.
- Nyvall R.F. (1999). *Field Crop Diseases*. Third edition, Iowa State University Press, USA, sid. 49.
- Piancastelli C., Ghidini F., Donofrio G., Jottini S., Taddei S., Cavirani S. & Cabassi C.S. (2009). Isolation and characterization of a strain of *Lichtheimia corymbifera* (ex *Absidia corymbifera*) from a case of bovine abortion. *Reproductive Biology and Endocrinology* 7: 138.
- Smith I.M., Dunez J., Lelliott R.A., Phillips D.H. & Archer S.A. (1988). *European handbook of plant diseases*. Blackwell scientific publications, England, sid. 224, 436-437.
- Stegmark R. (1994). Downey mildew on peas (*Peronospora viciae* f.sp. *psi*). *Agronomie* 14: 641-647.

Stoddard F.L., Nicholas A.H., Rubiales D., Thomas J. & Villegas-Fernández A.M. (2010). Integrated pest management in faba bean. *Field Crops Research* 115: 308–318.

Swensson C. (2006). Proteinfodermedel i ekologisk mjölkproduktion. Svensk Mjolk, Rapport nr 7056-P.

Voegelé R.T. (2006). *Uromyces fabae*: development, metabolism, and interactions with its host *Vicia faba*. *FEMS Microbiology Letters* 259: 165-173.

Internetlänkar

CABI. (2010). Centre for Agricultural Bioscience International. Crop Protection Compendium, 2010-09-11
<http://www.cabi.org/cpc/>

Kemikalieinspektionen, 2010-08-29
<http://apps.kemi.se/bkmregoff/>

Sp Sveriges Tekniska forskningsinstitut, 2010-06-03
<http://www.sp.se/sv/press/news/Sidor/20100304-2.aspx>

Statistiska Centralbyrån, 2010-04-09
http://www.scb.se/Statistik/JO/JO0601/2009A01a/JO0601_2009A01a_SM_JO19SM0902.pdf

Lerenius C. (2007). Hur undviker vi problem med skadegörare i åkerböna? Powerpointpresentation. Temadag ekologisk odling, Linköping.
www.jordbruksverket.se/download/18.2a19d05112133800c8b80001230/JanHillChokladflack%5B1%5D.ppt, 2010-09-11

Personlig kommunikation

Ulrik Lovang, Lovanggruppen, 2010-05-18

APPENDIX 1

Recept 3 % CTAB (Cetyl Trimetyl Ammonium Bromid)

12 g CTAB
130, 4 ml MQ
60 ml Tris-HCl pH8
208 ml 5M NaCl
1,6 ml EDTA
800 ml per prov användes vid DNA-extraktion

Recept PCR-mix till 400 prover

800 µl Buffer (10X)
160 µl dNTP-mix (10 mM µl⁻¹)
160 µl Forward primer (ITS1f, 10 nM µl⁻¹)
160 µl Reverse primer (ITS4, 10 nM µl⁻¹)
100 µl DreamTaq (5U µl⁻¹)
500 µl MgCl (25 mM µl⁻¹)
2220 µl MQ (milliQvatten)

Detta gav en slutkoncentration i varje prov av 2.75 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.2 µM av varje primer, 0.03 U µl⁻¹ DreamTaqTM DNA Polymeras (Fermentas AB) samt tillhörande buffert (10X). PCR-förutsättningarna var 94 °C i 2 minuter, 35 cykler med 30 sekunder i 94 °C, 30 sekunder i 55 °C och 30 sekunder i 72 °C, följt av 5 minuters extension vid 72 °C.

Recept enzym-mix till 400 prover

120 µl enzym (FastDigest® *AluI* (Fermentas), *CfoI* (Promega) eller FastDigest® *TaqI* (Fermentas))
400 µl tillhörande buffert
2280 µl ddH₂O

Till varje prov behövdes 0,3 µl enzym, 1 µl tillhörande buffert och 5,7 µl ddH₂O; 7µl av enzym-mixen och 3 µl av PCR-produkterna fördes till uppmärkta 8-brunnarsremсор med tillhörande lock. Dessa centrifugerades sedan i mindre än en minut vid 13000 rpm och stoppades i vattenbad. Remsorna med enzymet FastDigest® *AluI* (Fermentas) inkuberades i 37 °C under 15 minuter, enzymet *CfoI* (Promega) i 37 °C under två timmar och enzymet FastDigest® *TaqI* (Fermentas) var 15 minuter i 65 °C.

Recept LB-agar med Ampicillin och X-gal

10g NaCl
10g Trypton
5g Jästextrakt
20g agar
1 liter vatten

1ml Ampicillin

1,6ml X-gal

X-gal visar om bakterierna kan bryta ner betagalaktosidas, vilket är kopplat till en fungerande kloning. Om bakterierna har lyckats ta upp plasmiden (vektorn) med en ITS-region kan

bakterierna bryta ner betagalaktosidas och blir vita medan de blå bakteriekolonierna inte gjorde det och där har inte heller kloningen lyckats.

Spädning av DNA

Proverna späddes 20 ggr och därefter till 1 ng DNA μl^{-1} prov där andelen vatten och prov från första spädningen beräknades utifrån koncentrationsbestämningarna. Slutvolymen var 50 μl prov. Proverna blandades väl mellan spädningarna.

Rening av PCR-produkter

400 μl autoklaverad Sephadex G-50 mediumlösning (GE Healthcare Bio-science) tillsattes till de 96 brunnarna i en särskilt avsedd platta som tillhandahållits av det nämnda företaget. För att få bort överskottsvatten centrifugerades plattan i 1500 x g under två minuter. Därefter tillsattes de spädda PCR-produkterna till sephadexen och centrifugerades återigen i 1500 x g under två minuter ner i en ny 96-hålsplatta.

Kloning av ITS-regionen

Rening och fällning av de två poolade proverna med PCR-produkter från ITS-regionen i 336 prover gjordes med 70 μl 96 % EtOH och 2,8 μl natriumacetat vardera. Efter inkubation på is under 30 minuter centrifugerades provrören i 13000 rpm under 10 minuter. Vätskan pipetterades bort innan 100 μl 70 % EtOH tillsattes för att tvätta proverna. Därefter centrifugerades de två rören i 2 minuter i 13000 rpm. Vätskan pipetterades återigen bort och efter lufttorkning tillfördes 14 μl ddH₂O för upplösning av PCR-produkterna.

Vid legering togs 2 μl från de två poolade proverna och tillsattes i två nya eppendorfrör. I de två rören tillsattes även 1 μl saltlösning (NaCl), 2,5 μl ddH₂O och 0,5 μl TOPO®-vektor som fick stå i rumstemperatur (22-23 °C) under 30 minuter. Efter detta gjordes en transformering. Vid transformeringen användes TOP10-bakterier (*Escherichia coli*), och eftersom det var 50 μl bakterielösning i ett rör delades det upp på två rör. I rören tillsattes sedan 2 μl av lösningen med TOPO®-vektorn och detta ställdes på is i 30 min. Efter detta värmechockades proverna i exakt 30 sekunder i ett 42°C vattenbad och ställdes sedan direkt på is i två minuter. Därefter tillsattes 250 μl rumstempererat S.O.C-medium (Super Optimal broth Catabolite repression, med extra glykos,) och proverna skakades i 120 rpm i 37 °C under en timme. För att odla bakterierna användes LB-agar (Lysogeny broth-agar) med Ampicillin och X-gal enligt recept ovan. Mediet autoklaverades och fick svalna innan 1 ml Ampicillin och 1,6 ml X-gal tillfördes. Blandningen hölls sedan upp i petriskålar.

Under transformeringens slutskede förvärmades samtidigt LB-agarplattorna i 37 °C under 30 minuter och på dessa spreds sedan 50 μl respektive 150 μl av bakteriesuspensionen ut och inkuberades i 37 °C över natten för att sedan förvaras i kyl. Nittiosex vita klonkolonier (se avsnitt om kloning i Material och metoder) valdes ut och blandades ut i vardera 100 μl ddH₂O i varje brunn varav 25 μl användes till en PCR-reaktion. PCR-lösningen som då blev 50 μl hade samma koncentration som tidigare fast med primrorna M13 Forward och M13 Reverse. Även PCR-programmet var detsamma som tidigare.

Sekvensering av ITS-regionen

För att rena PCR-produkterna gjordes en AMPure-rening. Alla prover, som efter elektroforesen bestod av 45 μl , mixades med 81 μl AMPure-mix med magnetkuler som binder PCR-produkterna. Detta fick stå på en magnetplatta tills vätskan blivit klargrön, cirka 20 minuter. Då hölls vätskan ut och 200 μl 70 % EtOH tillsattes i två omgångar för att rena proverna. Sedan fick proverna stå på tork i 15 minuter. För att lösa upp produkterna tillsattes

60 μ l TE-Buffert och proverna blandades försiktigt med en vortex, därefter överfördes 50 μ l per prov till en ny platta och torkades in. Klonerna sekvenserades av Macrogen Inc. i Sydkorea. Klonernas sekvenser mellan primrarna M13 Forward och M13 Reverse samlades i grupper med 98 % noggrannhet med hjälp av SeqMan Genome Assembler (DNASStar Inc.). Sekvenserna kortades av så att enbart sekvensen mellan primerpositionen ITS1f och ITS4 visades.

Klippningen med restriktionsenzymer och sekvenseringen utfördes samtidigt och på samma sätt som för de klonade sekvenserna. Skillnaden var att proverna späddes 10 gånger (4 μ l DNA-prov och 36 μ l vatten) eftersom den ursprungliga koncentrationen var lägre.