

Förbättrad etablering av lusern – en förstudie

Ulf Axelson, Hushållningssällskapet Skaraborg

Anders Jonsson, SLU, Skara

U. Axelson^b och A. Jonsson^a

^a Avd för precisionsodling och pediometri, Institutionen för mark och miljö, SLU,
Box 234, SE- 523 23 Skara,

^b Hushållningssällskapet Skaraborg, Box 124. 532 22 Skara

Inom svensk foderproduktion är en av de stora utmaningarna att höja produktionen av inhemskt protein. I detta inbegrips även vallfoder. Bland baljväxterna har lusern på senare år blivit vanligare i vallfröblandningar. Ett problem som rapporterats både från rådgivare och lantbrukare är att det kan vara svårt att framgångsrikt etablera lusern.

Målsättning med detta projekt var att i växthus undersöka några olika faktorer som kan vara avgörande för en lyckad etablering av lusern. Utgångspunkten var fält där etablering och tillväxt inte motsvarat lantbrukare och rådgivares förväntningar. Genom att odla i jord från dessa fält med känt svagt resultat och behandla med olika kvävefixerande Rhizobium-ymp och tillsatts av mikronäring, har vi undersökt om vi kan förbättra etablering och tillväxt.

Sammanfattningsvis kan noteras:

- att det med enkla metoder i växthus gick att upprepa problem med etablering av lusern i jord från fält med etableringsproblem
- att det gick att bedöma effektiviteten på rhizobier på grödutveckling
- att det skiljde i effektivitet mellan olika rhizobiumpreparat
- att en sort lusern reagerade annorlunda (signifikant) för olika stammar av Rhizobium
- tillförsel av mikronäring i form av molybden och bor gav en positiv effekt på tillväxten
- att NIR spektrum innehåller information som gör det möjligt att objektivt gradera färgen på rhizobienoduler.

Bakgrund

En förutsättning för en lyckad etablering av baljväxter är att Rhizobium bakterie som bildar symbios med luserna är effektiv i sin kvävefixering. Naturligt finns ett stort antal Rhizobiestammar och effektiviteten att fixera kväve varierar mellan dem (Gibson et al., 1975). Vid sådd av lusern ympas i princip alltid utsädet med en Rhizobiumbakterie (*Rhizobium spp.*) och vid en lyckad inokulering uppnås stora skördeökningar.

Avgörande för utgången är dessa Rhizobiestammars förmåga att etablera sig på rötterna. Detta beror på hur konkurrenskraftiga bakterierna är och också vilken sort av lusern som skall etableras (Mårtensson och Ljungren, 1987; Bergersen, 1970; Singleton och Tavares, 1986).

Förmågan att ge en effektiv kvävefixering varierar mellan olika bakteriestammar, såväl naturligt förekommande och ympade (Gibson et al, 1975; Gao and Yang, 1995, Binde et al., 2009, Bergersen, 1970, Reeve et al, 1993) Förutom konkurrens mellan Rhizobiumstammar kan det också uppstå konkurrens mellan Rhizobium (Mårtensson och Ljungren, 1987; Ljungren, 1993) och andra frilevande typer av bakterier, tex Pseudomonas (Berggren, 1998). För klöver hävdas att en ympning endast kan göra sig gällande om förekomsten av lokala Rhizobiumstammar i jorden är låg (Ljungren, 1993) eller att de lokala stammarna har en låg konkurrenskraft (Singleton och Tavares, 1986).

Ytterligare faktorer som kan påverka tillväxten av *Rhizobium* är tillgänglighet till vissa näringsämnen. Det gäller t ex. molybden (Mo), kalcium (Ca), bor (B) och fosfor (P) (Bonilla och Bolanos, 2009). Molybden ingår i i enzymet nitrogenas som styr N-fixeringen (Kaiser, 2005). Även om det kan finnas tillfredställande halter i marken, så kan anaeroba och sura förhållande inne i bakterie-nodulerna begränsa upptaget (Bonilla and Bolanos, 2009). Försök med positiv effekt av molybdenet har gjorts bla i Sydafrika, med att tillsammans med ympningen tillsätta Mo direkt på utsädet (Bambara and Ndakdemi, 2009; Gupta et al., 2001). Därtill kommer att även låga halter av järn (Fe), kobolt (Co) och kalium (K) har rapporterats störa fixeringen och därmed grödans utveckling. Dessutom påverkar effekterna av pH-värde både växten och de kvävefixerande mikroorganismerna (Geijerstam, 2001).

Avsikten med denna första studie var att undersöka om problembilden i fält kan upprepas i växthus och om hämning i tillväxt kan mildras/hävas genom tillförsel av några olika sk baljväxt ympar. Det kan också vara olika ymp som passar till olika sorter. För att minska risken att en eventuell näringsbrist skall störa försöket tillfördes också mikronäring i form av B och Mo, i en av behandlingarna.

En framtida utveckling av detta projekt är att utveckla ett växthustest för att bestämma hur effektiv kvävefixeringen är hos ett fälts N-fixerare och se om det är möjligt att ersätta en växttest med analys av förekomsten av specifikt rhizobie-DNA.

Material och metoder

Jord från fyra fält samlades in på hösten 2012. På tre av jordarna hade det varit problem med etablering av lusern (K, Rö, Rå) och på den fjärde jorden (I) har etablering varit mycket god. I används som kontroll.

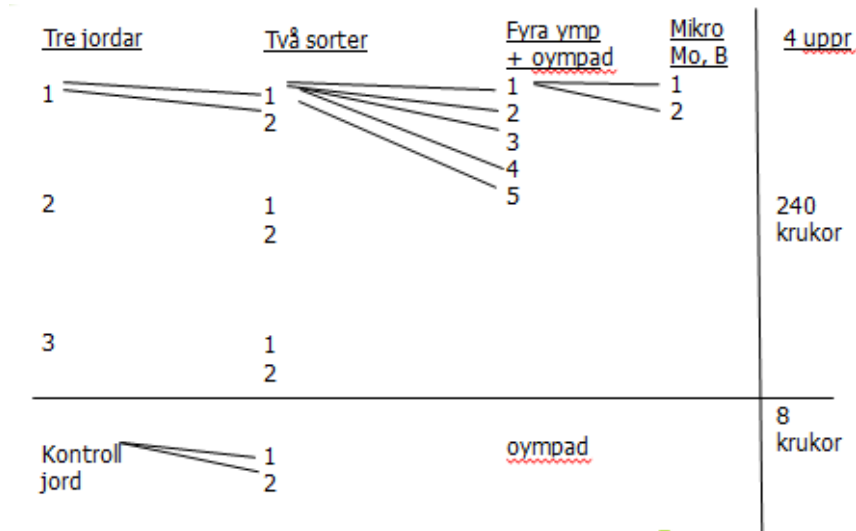
Fält	pH	P-Al mg/100 g	K-Al mg/100 g	Mg-Al mg/100 g	P-HCl mg/100 g	K-HCl mg/100 g	Cu-HCl mg/100 g	Mo mg/kg
K	5,9	5,9	4,8	4,5	81	83	14	7,7
I	7,7	9,9	12	11	130	290	49	23
Rå	6,5	6,8	11,0	4,8	96	65	11,0	0,93
Rö	6,5	6,5	4,2	8,5	64	75	8,0	1,2

Tabell 1. Jordanalyser från provjordarna.(provdjup 0-20 cm)

K= Källegården, I= Ingefredsgården, Rå=Rådde, Rö=Rössberga

Utsädet såddes i enliters plastkrukor fyllda med samma volym med jord. I varje kruka såddes 10 frön. Sådden gjordes den 18 september. Den 24 och 25 oktober gallrades krukorna med målsättning att ha 5 stycken plantor i varje kruka. Ogräs plockades bort manuellt.

Mikronäringen i form av molybden., Molytrac 250, (<http://www.yara.se/crop-nutrition/products/yaravita/1007-yaravita-molytrac>) och bor, Bor Super (http://www.gullviks.se/produkter/produkter_bor_super.pdf) tillsattes efter uppkomst i utspädd form den 30 oktober. Dosen motsvarade den som används i praktiskt jordbruk. För bor rekommenderas 300 g per ha och för molybden 62 g per ha. Spädning av mikronäringen gjordes så att dosen motsvarade hektardosen på den yta som krukorna representerade. Krukorna placerades i växthus där temperaturen fram till början av december hölls på 14 grader. Belysning tillsattes för dagslängd mellan kl. 06.00 och kl. 22.00. Mellan december och februari hölls temperaturen på ca 5 grader. I slutet av februari höjdes temperaturen succesivt.



Figur 1. Försöksplan

I tre av jordarna (K,Rö,Rå) såddes två stycken lusernsorter med fyra olika ymp plus en oympad kontroll. De sorter som användes och ympades med rhizobier var Lucelle och Daphne. I ett försöksled tillsattes mikronäring. I den fjärde jorden, kontrolljorden, såddes oympad lusernfrö av sorten Lucelle.

Ymparna som användes var tre stycken ympar från en svensk leverantör, "Inocula.scandinavica" www.inocula.se och en ymp från Novozyme, www.bioag.novozymes.com/en/products/canada/Pages/default.aspx

Ympningen utfördes på laboratorium där rekommenderad mängd ymp tillfördes till respektive utsäde. Ymp 1 och 3 var ymp utblandad i jordsubstrat och slammades upp för att sedan tillföras utsädet. Ymp2 var i lösning och ymp 4 i form av torr vara baserad på kvartssand.

Ymp	Nr	Jord	Nr	Sort	Nr
Kanadensisk	1	Källegården	1	Daphne	1
Koncentrerad	2	Rådde	2	Lucelle	2
Lucern	3	Rössberga	3		
Ärt o Å-böna	4	Ingefredsgården			

a.

b.

c.

Tabell 2. Använda ympar (a), jordar (b) och sorter (c)

Krukorna graderades vid två tillfällen, 10 december 2012 och 9 april 2013. Beståndet graderades utifrån en åttagradig skala där 1 var sämst bestånd och 8 bäst bestånd. Färgen graderades utifrån en femgradig skala där 1 var minst grön färg och 5 var grönast färg. Utifrån bestånds- och färg-gradering beräknades sedan ett tillväxtindex. Indexet är beräknat som en faktor mellan beståndstillväxt och färg, $(\text{bestånd} \cdot \text{färg} / 2)$. Ett bestånd på 4 och färg 3 fick ett tillväxtindex på 6.

Plantorna skördades den 10 december och 14 april. Det skördade materialet torkades i värmeskåp i 55 C.

I sambandet med att försöket avslutades räknades och graderas bakterieknölnarna på rötterna efter storlek, utseende (röda/vita) samt placering på roten. Samtidigt togs ett spektra på knölnarna upp med ett NIR-instrument (Nära Infraröd Reflektans). Detta instrument från ASDI mäter också reflektans i det synliga våglängdsområdet (ASDI Fieldspec Pro FT).

www.ASDI.com). Avsikten var att testa om det går att bedöma knölarnas färg och därmed indirekt deras kondition. NIR-tekniken kan bli ett enkelt moment för att titta på effektivitet hos knölar i biotester.

Materialet är bearbetat statistiskt med SAS.

Resultat

Resultaten visar att det finns en skillnad mellan ymparna när man ser till tillväxtindex oavsett sort eller jord (tabell 3).

Resultaten för ymparna visar samma resultat även vid en uppdelning på respektive sort (tabell 4 och 5).

Ymp 1 ger högst värde följt av ymp 4, ymp 3 och lägst tillväxtindex får lusernen som ympats med ymp 2. Även delskördarna och totalskörden visar samma resultat med ymp 1 som ger högst skörd (tabell 6).

Ymp	Tillväxtindex	Rel tal
oympad	3,1(a)	100
1	10,8(b)	348
2	4,7(c)	151
3	5,6(d)	180
4	6,8(d)	219
P värde	< 0.0001	

Tabell 3. Tillväxtindex för ymparna för båda sorterna och i alla jordarna. Avläsning april 2013. Tillväxtindex= beståndsutveckling*färg/2

Värden med olika bokstäver skiljer sig åt ($p < 0,05$). Värden beräknade enligt SAS.

Ymp	Tillväxtindex	Rel tal	Tillväxtindex	Rel tal
	Sort 1	Rel tal	Sort 2	Rel tal
oympad	4,0 (a)	100	2,1 (a)	100
1	11,9 (b)	298	9,7 (b)	461
2	5,4 (a,e)	135	4,1 (a,c)	195
3	7,1 (c,d,e)	177	4,1 (a,c)	195
4	8,2 (d)	205	5,4 (c)	257
p	<0,0001		<0,0001	

Tabell 4. Tillväxtindex för respektive sort 1 och 2 med ymp i alla jordar med och utan mikro.

Avläsning april 2013. Värden med olika bokstäver skiljer sig åt ($p < 0,05$). Tillväxtindex= beståndsutveckling*färg/2. Värden beräknade enligt SAS.

Ymp	Tillväxtindex	Rel tal	Tillväxtindex	Rel tal	Jord 3	Rel tal
	Jord 1	Rel tal	Jord 2	Rel tal	Jord 3	Rel tal
oympad	3,1	100	3,6	100	3,9	100
1	4,9	158	16,4	456	11	282
2	1,7	55	7,7	214	4,8	123
3	4,4	142	7,9	219	4,8	123
4	4,4	142	9,3	258	6,3	162
p	<0,0001		<0,0001			

Tabell 5. Tillväxtindex för respektive jord 1, 2 och 3 med ymp i alla jordar oavsett sort samt med och utan mikro. Avläsning april 2013. Tillväxtindex=beståndsutveckling*färg/2.

Värden beräknade enligt SAS.

Ymp	dec 2012 ts g	Rel tal	april 2013 ts g	Rel tal	totalskörd ts g	Rel tal
oympad	0,5 (a)	100	1,1 (a)	100	1,5 (a)	100
1	0,9 (b)	180	2,7 (b)	245	3,6 (b)	240
2	0,6 (c)	120	1,5 (c)	136	2,2 (c)	147
3	0,8 (d)	160	1,9 (c,d)	172	2,7 (d)	180
4	0,5 (a)	100	2,0 (d)	181	2,5 (c,e)	167
p	< 0,0001		<0,0001		<0,0001	

Tabell 6. Torrsubstansskörd. Delskördar samt totalskörd för bägge sorterna vid avläsning i december, april samt totalskörd. Värden med olika bokstäver skiljer sig åt ($p < 0,05$). Värden beräknade enligt SAS.

Ymp	bestånd	Rel tal		Rel tal	färg	Rel tal		Rel tal
	dec		april		dec		april	
oympad	3,5 (a)	100	2,3 (a)	100	3,1 (a)	100	2,7 (a)	100
1	5,4 (b)	154	5,3 (b)	230	3,6 (b)	116	3,8 (b)	140
2	4,0 (c)	114	3,3 (c)	143	2,9 (c)	94	2,7 (a)	100
3	4,9 (d)	140	3,8 (c)	165	3,3 (c)	106	2,8 (a)	103
4	4,9 (d)	140	3,8 (c)	165	3,2 (c)	103	3,4 (c)	126
p värde	<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001	

Tabell 7. Tillväxtindex för ymparna för båda sorterna och i alla jordarna med avseende på färg och beståndsgradering. Värden med olika bokstäver skiljer sig åt ($p < 0,05$). Värden beräknade enligt SAS.

Mikronäringstillförsel

Tillsatsen av mikronäring i form av Mo och B har i decembergraderingen inte gett några skillnader. Däremot har det vid graderingen i april gett skillnader som visar på högre tillväxtindex efter mikrotillförsel (tabell 8). Ju högre tillväxtindex desto större ökning av vid tillförsel av mikro vid gradering i april.

Tillväxtindex						
Jord						
	1	rel tal	2	rel tal	3	rel tal
Utan mikro,dec	5,3	100	9,8	100	8,5	100
Med mikro,dec	5,1	96	8,9	90	8,0	85
	p=0,63		p=0,08		p=0,20	
Utan mikro,april	3,2	100	7,2	100	5,1	100
Med mikro,april	4,3	134	10,8	150	7,2	141
	p=0,08		p<0,001		p=0,0002	

Tabell 8. Tillväxtindex med och utan mikro för bägge sorterna (värden beräknade enligt SAS).

Kontrolljord

Vid graderingar av kontrolljorden, Ingefredsgården, har tillväxtindex vid båda tillfällena varit högre i än oympad i övriga jordar. Tabell 9 visar graderingen i oympad för respektive sort och jord vid graderingen i april. Endast vid ett tillfälle, sorten Luselle i jord från Rådde vid avläsning i april, har ympning gett ett högre tillväxtindex än det uppmätta värdet för oympad Luselle i kontrolljorden.

	Tillväxtindex sort 1				Tillväxtindex sort 2			
	jord 1	Jord 2	Jord 3	kontrolljord	Jord 1	Jord 2	Jord 3	kontrolljord
oympad	4,3	3,0	3,3	17,5	0,5	2,6	3,3	12,5
bästa ymp	8,6	14,9	8,3		5,3	16,3	10,1	

Tabell 9. Tillväxtindex för oympat i kontrolljorden och för båda sorterna i respektive jord vid avläsning i april samt högsta tillväxtindex för bästa ympen i jord 1-3 (Rakt medelvärde).

Resultaten visar på att det finns en skillnad i effektivitet hos de olika ymparna. Vid en jämförelse mellan ymparna har ymp 1 gett högst tillväxtindex samt också högst torrsubstanstillväxt. Det kan också konstateras att i jord 1, där det var störst problem att etablera lusernen och också lägst pH, är effekten av ymparna mindre.

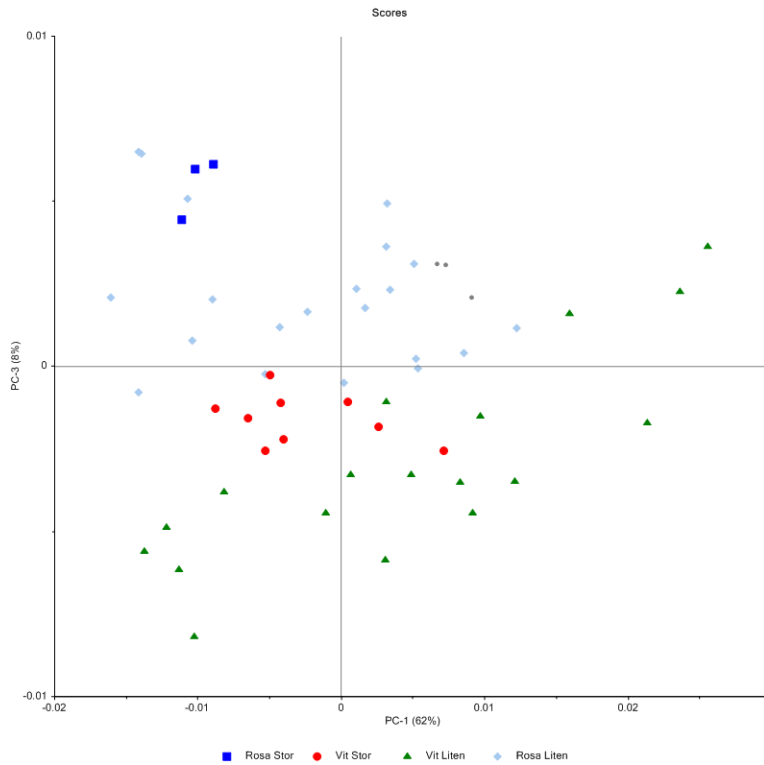
NIR-spektrumfrån rhizobie-knölar

En principalkomponent i en sk principal komponent analys (en sk PCA plot) är en linjär beskrivning av mesta möjliga variation i en flerdimensionell rymd. Varje våglängd utgör en dimension i analysen. Eftersom samvariationen mellan våglängderna är stark kan man på detta sätt reducera antalet dimensioner och beskriva variationen med ett fåtal latent variabler, s.k. principalkomponenter och ändå förklara det mesta av variationen. Brus hamnar i den del som inte förklaras. I PCA-plotten ligger prover som är lika varandra nära varandra. Genom deriveringen korrigeras för baslinjeförskjutningar och spektrala egenskaper förstärks. Principalkomponent 1 förklarar i denna undersökning mest av den totala variationen (62 %), men denna variation skiljer inte mellan de klasser som definierats vid den okulära bedömningen av knölar.

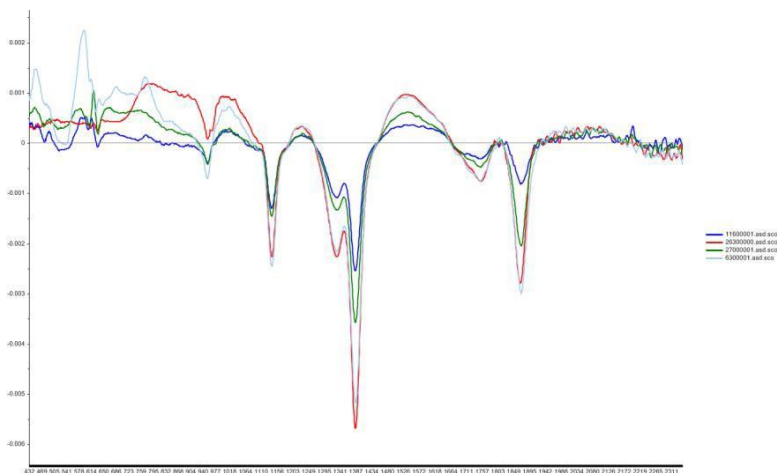
Däremot i kombinationen med PCA komponent 3 kan knölar som bedömdes vara rosa separeras från de som var vita knölar samt de stora kan skiljas från de små (figur 2). D.v.s. resultaten indikerar att det går att använda NIR-tekniken för att på objektivet sätt ersätta en human okulär besiktning av rhizobieknölar!

I komponent PC 3 har den synliga delen av spektrumet störst inflytande (figur 3) och det är helt enkelt färgen som beskrivs i komponent PC3. I PC 1 har våglängdsband runt 1400, 1900 och 1100 nm störst inflytande och de förklaras främst med skillnader i vattenhalt mellan proven (absorptionsbanden vid 1400 och 1900 nm korrelerar till vattenmolekyler).

Vilken/vilka kemiska föreningar som speglas av informationen i 1100 nm återstår att reda ut.



Figur 2. PCA-plot av de deriverade NIR-spektrum från rhizobieknölnarna.



Figur 3. Figuren visar adsorptionen i de olika våglängdsbanden.

Diskussion

Problem med svag etablering i fält gick att upprepa i växthus och kunde mätas som försämrade tillväxt och blekhet hos de båda lusersorterna. Det gick också att förbättra tillväxten genom ympning. Detta visar att det kan vara en möjlighet att använda växthustest för att undersöka orsaker till svag etablering. Men det återstår att visa att det som ger effekt i växthus också ger positiv effekt under fältförhållanden.

En ympbehandling visade signifikant bättre tillväxt än övriga på de tre problemjordarna och för de båda sorterna (tabell 4). Detta indikerar att valet av ymp är viktigt för optimal

anpassning och utveckling av luserngrödan. Detta med olika effekter av rhizobieympar har noterats tidigare för lusern vad gäller olika stammars tålighet på jordar med låga pH-värde i jorden. (Rice, 1982; Reeve et al., 1993), och för *Vigna unguiculata* (ögonböna) i en undersökning kring olika rhizobie isolats effekt på nodultillväxt och grönmassetillväxt (Ferreira et al., 2011)

Effekten av mikronäringen var signifikant vid den senare avläsningen, tabell 8. Detta stämmer med tidigare noterade effekter av mikronäring som Molybden (Mo) och Bor (B) (Bonilla and Bolanos, 2009; Gupta et al., 2001). I ett växthustest och i fältförsök med *Phaseolus vulgaris* (trädgårdsböna) i Sydafrika påvisades klara skillnader i bl.a klorofyllinnehåll i bönan vid tillsats av Mo (Bambara and Ndakidemi, 2009).

Risken är att den noterade effekten av tillförseln av mikronäring orsakas av att en liten jordvolym står till förfogande för rotsystemet. För att klargöra att krävs fältförsök.

Mätningarna med NIR visar på att det går att använda ett ”objektivt” NIR-instrument för att gradera rhizobieknölers färg. Det kan också finnas direkt information om N-halt i knölna vid våglängdsbandet kring 1100 nm. Det senare återstår att utreda

Ett möjligt nästa steg är också att utnyttja kvantitativa DNA-metoder, s.k. PCR-metoder för att bestämma förekomsten av olika rhizobiestammar i marken. Inom denna första studie kommer DNA att extraheras ur jordproven för att ev. kunna analyseras vid senare tillfälle. (Jia et al, 2008; Binde et al, 2009).

Sammanfattningvis kan följande konstateras från detta projekt:

- att det med enkla metoder i växthus gick att upprepa problem med etablering av lusern i jord från fält med etableringsproblem
- att det gick att bedöma effektiviteten på rhizobier på grödutveckling
- att det skiljde i effektivitet mellan olika rhizobiumpreparat
- att en sort lusern reagerade annorlunda (signifikant) för olika stammar av Rhizobium
- tillförsel av mikronäring i form av molybden och bor gav en positiv effekt på tillväxten
- att NIR spektrum innehåller information som gör det möjligt att objektivt gradera färgen på rhizobienoduler.

Resultatförmedling till näringen

Projektet har redovisats vid Växjö möte den 4 december 2012 och vid Uddevallakonferensen den 9 januari 2014. Skriftlig presentation finns i respektive konferensrapport. En artikel är publicerad i tidningen Arvensis nummer 5, 2013.

Referenser:

Bambara S., Ndakidemi P.A., 2009. Effects of Rhizobium inoculation, lime and molybdenum on photosynthesis and chlorofyll content of *Phaseolus vulgaris* L. African Journal of Microbiology Research Vol 3.(11) pp. 791-798.

Bergersen F.J., 1970. Some Australian studies to the long-term effects of the inoculation of legume seeds. Plant and soil 32, 727-736

Berggren I., 1998. Konkurrens mellan Rhizobium och tillväxthämmande rotbakterier- påverkan på symbiotisk kvävefixering hos ärter. Ekologiskt lantbruk, Forsknings och utvecklingsprojekt, 1998. SLU, Centum för uthålligt lantbruk 5

- Binde, DR., Menna, P.,; Bangel, EV Barcellos, FG ; Hungria, M 2009* ,rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 83 , 5, 897-908
- Bonilla I., Bolanos L., 2009.* Mineral Nutrition for Legume- Rhizobia Symbiosis: B, Ca, N, P, S, K, Fe, Mo, Co, and Ni: A Review. *Organic Farming, Pest Control and Remediation of Soil Pollutants, Sustainable Agriculture Reviews* 1, 253-274.
- Ferreira,E.P.D, Martins, L.M.V, Rumjanek, N.G.,(2011)* Nodulation and grain yield by cowpea (*Vigna unguiculata*) inoculated with rhizobia isolates.*Reevista caatinga* 24, Issue 4, 27-35
- Gao W.M. and Yang, S.S., 1995.* A Rhizobium strain that nodulates and fixes nitrogen in association with alfalfa and soybean plants. *Microbiology* 1995, 141, 1957-1962.
- af Geigersstam L., 2001.* Kvävefixering hos baljväxter i svenska jordar vid lågt pH- värde. Rapport 3. SLU, Institutionen för ekologi och växtproduktionslära .
- Gibson, A. H. et.al., 1975.* Studies of field populations of Rhizobium. *Soil Biochem.* Vol. 7. Pp95-102. Pergamon Press. Great Britain
- Graham, P. H. och Parker, C. A. (1964).* Diagnostic features in the characterisation of the rootnodule bacteria of legumes. *Plant and Soil* **20**, 383-396.
- Gupta,U.C.et.al.2001.*Micronutrients in grasslands production
www.internationalgrasslands.org/files/igc/publications/2001/tema4-2.pdf-2011-06-20
- Jia R.Z., Gu J., Tian, C. F., Man, C. X., Wang E.T. and Chen W. X, 2008.* Screening of high effective alfalfa rhizobial strains with comprehensive protocol. *Annals of microbiology*, 58 (4), 731-739.
- Kaiser,B.N., Gridley, K.L., Brady, J.N.,Phillp, T., Thyerman, S.D., 2005.* The role of Molybdenum in agricultural plant production. *Annals of Botany* 96, 745-754.
- Ljunggren H., 1993.* Kvävefixering hos nya klöverarter. Fakta-Mark/Växt nr 4. SLU Kontakt/Redaktionen.
- Mårtensson A., Ljunggren H., 1987.* Varför uteblir ibland effekten med baljväxtkulturer? .Fakta-Mark/Växter nr 20. SLU Kontakt/Redaktionen.
- Singleton, P, W. and Tavarnes, J. W., 1986.* Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness Rhizobium populations. *Applied and environmental microbiology*, 1986. P. 1013-1018. American society of microbiology
- Reeve, W. G., Tiwari, R. P., Dilworth, M. J. och Glenn, A. R. (1993).* Calcium effects of the growth and survival of Rhizobium meliloti. *Soil Biology and Biochemistry* **25**, 581-586.
- Rice, W. A. (1982).* Performance of Rhizobium meliloti strains selected for low pH tolerance.*Canadian Journal of Plant Science* **62**, 941-948.