

EFFECT OF VARIOUS STRAINS OF SYMBIOTIC BACTERIA ON YIELDS AND NODULATION OF LUPINE AND SOYBEAN

Summary

The aim of these studies was to assess various isolates of symbiotic bacteria of lupine and soybean with respect to their effects on nodulation and seed yields of the crops. Strains of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) and *Bradyrhizobium japonicum*, belonging to the collection of these bacteria at Dept. of Agricultural Microbiology IUNG-PIB Puławy, were used for inoculation of lupine seeds (cv. Mister and Baron) and soybean seeds (cv. Aldana and Nowiko). In pot experiments (Mitscherlich pots containing 7 kg of soil) none of the tested strain of lupine rhizobia significantly increased lupine seed yields though some of these strains improved nodulation of lupine plants. All *B. japonicum* strains – soybean symbionts – markedly stimulated nodulation and significantly improved seed yields of both soybean cultivars.

Key words: lupine, soybean, yielding, nodulation, symbiotic bacteria, field experimentation

WPŁYW RÓŻNYCH SZCZEPÓW BAKTERII SYMBIOTYCZNYCH NA PŁONY I BRODAWKOWANIE ŁUBINU I SOI

Streszczenie

Celem badań była ocena różnych szczepów bakterii symbiotycznych łubinu i soi pod względem ich oddziaływania na brodawkowanie i plon nasion wymienionych roślin. Do badań użyto izolatów *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) i *Bradyrhizobium japonicum* znajdujących się w kolekcji bakterii symbiotycznych Z. Mikrobiologii IUNG-PIB w Puławach, którymi zaszczepiono nasiona łubinu żółtego (odm. Mister) i łubinu wąskolistnego (odm. Baron) oraz soi (odm. Aldana i Nawiko). W doświadczeniu wazonowym (wazony Mitscherlicha z 7 kg gleby) nie stwierdzono na ogół istotnego wpływu zastosowanych szczepów *Bradyrhizobium* sp. na plonowanie łubinu, chociaż większość użytych szczepów stymulowała brodawkowanie na korzeniach tej rośliny. Badane szczepy *B. japonicum* różniły się pod względem ich oddziaływania na brodawkowanie soi, ale wszystkie szczepy tych bakterii symbiotycznych przyczyniły się do istotnego wzrostu zarówno intensywności brodawkowania, jak i plonowania obydwu odmian soi.

Słowa kluczowe: łubin, soja, plonowanie, brodawkowanie, bakterie symbiotyczne, badania polowe

1. Wstęp

Rośliny bobowate (motylkowate) są ważnym źródłem białka dla ludzi i zwierząt hodowlanych, a ich uprawa wpływa korzystnie na żyzność gleb i plonowanie innych roślin uprawianych w zmianowaniu, zwłaszcza w warunkach rolnictwa integrowanego i ekologicznego [1-6]. Jednym z najważniejszych czynników wpływających na wzrost i plonowanie omawianych roślin są bakterie symbiotyczne indukujące powstawanie na korzeniach brodawek symbiotycznych, w których odbywa się proces redukcji azotu atmosferycznego do formy amonowej, pobieranej przez roślinę motylkową [1-3, 7-9]. Wcześniejsze badania autorów wykazały, że gleby w Polsce są bardzo zróżnicowane pod względem zasiedlenia i liczebności populacji bakterii symbiotycznych poszczególnych gatunków roślin bobowatych [4]. Występowanie bakterii tworzących układ symbiotyczny z łubinem analizowano w próbkach 80 gleb i w 24 z nich liczebność tych bakterii była duża (ponad 1000 komórek g^{-1}). Najwięcej (37) gleb charakteryzowało się średnimi (> 100 do 1000 komórek g^{-1}) lub małymi (do 100 komórek g^{-1}) populacjami i aż w 19 glebach nie stwierdzono obecności symbiontów łubinu. Bakterie symbiotyczne soi jeszcze rzadziej występują w naszych glebach, głównie z tego względu, że soja w Polsce jest bardzo rzadko uprawiana przez rolników i w Europie roślina ta (lub gatunki spokrewnione) nie występuje w stanie dzikim. Powyższe dane wskazują na potrzebę przedsięwzięcia zaprawiania na-

sion łubinu, a zwłaszcza soi szczepionkami zawierającymi bakterie symbiotyczne tych roślin.

Zakład Mikrobiologii IUNG-PIB w Puławach dysponuje kolekcją licznych izolatów bakterii symbiotycznych roślin bobowatych, a celem podjętych badań była selekcja najefektywniejszych symbiontów łubinu i soi na podstawie ich oddziaływania na brodawkowanie i plonowanie tych roślin.

2. Materiały i metody

2.1. Materiał biologiczny

Wszystkie szczepy bakterii użyte w badaniach pochodziły z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Rolniczej IUNG-PIB Puławy. W przeprowadzonych badaniach wykorzystano dziesięć szczepów bakterii symbiotycznych łubinu (*Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)): A, H, NF, Ł93, KO, ŁGK, CZ, PP, ŁN i T2, oraz dziesięć izolatów bakterii symbiotycznych soi (*Bradyrhizobium japonicum*): 78B, L, PO, PR, 138, 110, 94P, CB82, KR i II.

Nasiona łubinu żółtego (odm. Mister) łubinu wąskolistnego (odm. Baron) oraz soi (odm. Aldana i Nawiko) uzyskano od krajowych hodowców wymienionych roślin strączkowych.

2.2. Doświadczenie wazonowe

W doświadczeniu tym, przeprowadzonym w hali wegetacyjnej, wykorzystano glebę kompleksu pszennego dobre-

go (piasek gliniasty) pobraną z pola doświadczalnego Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – PIB w Puławach. Gleba na tym polu zawierała w 1 gramie około 9×10^2 komórek bakterii symbiotycznych łubinu i niewielkie populacje (około 10 komórek w 1 gramie gleby) bakterii symbiotycznych soi. Wazony Mitscherlicha wypełniono 7 kg materiału glebowego, składającego się z 5 kg scharakteryzowanej powyżej gleby i 2 kg piasku rzecznoego. Przed napełnieniem wazonów wilgotność gleby ustalono na poziomie 40% całkowitej pojemności wodnej (CPW) i dodano nawozy (w g wazon⁻¹): KH₂PO₄ – 1,92, K₂SO₄ – 1,11 i MgSO₄ – 1,0. Po napełnieniu wazonów i wysadzeniu nasion (10 nasion wazon⁻¹) wilgotność gleby uzupełniono do 60% CPW i na tym poziomie utrzymywano ją przez cały okres wegetacyjny łubinu i soi. Po wschodach pozostawiono po 5 siewek w każdym wazonie. Przed siewem nasiona łubinów i soi szczepiono preparatami zawierającymi bakterie symbiotyczne tych roślin. Po zastosowaniu szczepionek pobierano próbki nasion w celu oznaczenia liczebności wymienionych bakterii na powierzchni nasion. Oznaczenia te wykonywano metodą płytkową, polegającą na wysiewie odpowiednio rozcieńczonych zmywów z nasion na płytki Petriego zawierające agarową pożywkę YEMA z dodatkiem Congo Red w przypadku rizobiów [5, 11]. Przeprowadzone analizy wykazały, że na powierzchni jednego nasiona znajdowało się około $1-2,5 \times 10^6$ jtk rizobów.

Każdy obiekt doświadczalny (szczep) składał się z 5 wazonów (powtórzeń). W fazie kwitnienia roślin zlikwidowano po jednym wazonie z każdego obiektu doświadczalnego i określono intensywność brodawkowania oraz suchą masę części nadziemnych. Ze względu na to, że brodawki na korzeniu głównym badanych roślin tworzą się w postaci różnej wielkości skupisk trudno jest określić liczbę brodawek, dlatego intensywność brodawkowania określano wg następującej skali: 0 = brak brodawek, 1 = brodawki na korzeniach bocznych, 2 = małe skupiska brodawek na korzeniu głównym i brodawki na korzeniach bocznych, 3 = duże skupiska brodawek na korzeniu głównym i brodawki na korzeniach bocznych.

W fazie dojrzałości oznaczono liczbę strąków i nasion oraz plon nasion.

3. Wyniki i dyskusja

Liczne brodawki symbiotyczne znajdowane na korzeniach łubinów i znacznie słabsza intensywność brodawkowania na korzeniach soi w obiektach bez szczepionek, (tab. 1-2), potwierdzają wyniki analiz mikrobiologicznych przeprowadzonych przed założeniem doświadczenia wazonowego świadczące, że w glebie użytej do tych doświadczeń znajdowały się duże populacje bakterii symbiotycznych łubinu (*Bradyrhizobium* sp.) i znacznie mniejsze liczebności bakterii symbiotycznych soi (rys. 1). Różnice ilościowe w glebowych populacjach wymienionych bakterii miały też swoje odzwierciedlenie w zróżnicowanej reakcji badanych roślin strączkowych na szczepionki zastosowane do przed-siewnego otoczkowania (szczepienia) nasion tych roślin.

W doświadczeniu wazonowym z łubinem żółtym większość szczepów (NF, Ł93, ŁGK, CZ, PP, ŁN, T2 i H) *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) spowodowała istotne zwiększenie intensywności brodawkowania na korzeniach łubinu, w porównaniu do brodawkowania tej rośliny w obiekcie bez stosowania szczepionek (tab. 1). Pozostałe dwa izolaty *Bradyrhizobium* sp. testowane w omawianym doświadcze-

niu wazonowym również miały korzystny wpływ na proces brodawkowania, ale efekt ten nie był istotny statystycznie w odniesieniu do kontroli nieszczepionej (tab. 1). Zwiększona intensywność brodawkowania, zwłaszcza pod wpływem szczepów NF, Ł93 i PP, nie miała jednak istotnego odzwierciedlenia w plonowaniu łubinu żółtego (tab. 1).



Rys. 1. Brodawki na korzeniach soi bez szczepionki (K) i soi szczepionej izolatem PR *Bradyrhizobium japonicum*
Fig. 1. Nodules on uninoculated soybean roots (K) and on soybean inoculated with isolate PR of *Bradyrhizobium japonicum*

Brak istotnego przyrostu plonów nasion łubinu żółtego pod wpływem zastosowanych szczepionek związany był właśnie ze wspomnianą już wcześniej dużą liczebnością (9×10^2 w 1 g gleby) rodzimych bakterii symbiotycznych łubinu w glebie użytej w doświadczeniu wazonowym. Brodawkowanie łubinu w obiekcie kontrolnym, w którym nie stosowano szczepienia nasion preparatami bakterieryjnymi było wystarczająco intensywne, aby zapewnić prawidłowy wzrost i plony nasion, m.in. w wyniku wystarczającego zapotrzebowania roślin łubinu na azot związany symbiotycznie. Dodatkowe populacje bakterii symbiotycznych wprowadzone na nasiona łubinu żółtego, choć przyczyniały się do zwiększenia intensywności brodawkowania, to na ogół nie miało to istotnego wpływu na plonowanie tej rośliny. Wcześniejsze badania różnych autorów wykazały, że korzystne efekty stosowania szczepionek rizobiowych uzyskiwane są tylko wtedy, gdy brak jest tych bakterii w glebach lub, gdy ich liczebność jest niska (poniżej 10 komórek w 1 gramie) [2, 8-10].

Podobny wpływ badanych szczepionek bakterii symbiotycznych stwierdzono w doświadczeniu wazonowym z łubinem wąskolistnym (tab. 1), jednak wyniki tego doświadczenia zostały zniekształcone przez silną infekcję roślin przez grzyby zgorzelowe. Przyczyn tej infekcji nie udało nam się ustalić, ale najprawdopodobniej użyte w tym doświadczeniu nasiona były silnie zakażone przez wymienione grzyby, choć zakupione one zostały w Centrali Nasiennej i nie wykazywały zewnętrznych oznak porażenia. Większość zainfekowanych roślin łubinu wąskolistnego obumarła tuż po kwitnieniu, a wyniki przedstawione w tab. 1 opracowano na podstawie różnej liczby roślin w fazie kwitnienia i w związku z tym nie zostały one poddane analizie statystycznej.

Reakcja soi na badane preparaty szczepionkowe była zupełnie inna niż łubinu, a różnice te wynikały, jak już wspomniano wcześniej, ze zróżnicowanego zasiedlenia gleby użytej do napełnienia wazonów przez bakterie symbiotyczne wymienionych roślin.

Tab. 1. Wpływ szczepienia nasion łubinu żółtego (odm. Mister) i wąskolistnego (odm. Baron) różnymi szczepami bakterii symbiotycznych (*Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)) na intensywność brodawkowania i plony nasion oraz pędów
 Table 1. Effect of seed inoculation with different strains of symbiotic bacteria (*Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)) on nodulation intensity and seed yields of yellow (cv. Mister) and blue lupine (cv. Baron)

Obiekty Treatments	Łubin żółty / Yellow lupine		Łubin wąskolistny / Blue lupine	
	Intensywność brodawkowania Nodulation intensity	Masa nasion (g wazon ⁻¹) Seed weight (g)/pot	Intensywność brodawkowania Nodulation intensity	Sucha masa pędów (g wazon ⁻¹)* Stem dry matter weight (g)/pot
Nasiona nieszczepione Uninoculated seeds	2,0 a ²	13,9 a	1,6	6,0
Nasiona szczepione: Seeds inoculated:				
NF ¹	3,0 b	14,6 a	1,2	8,0
Ł93	3,0 b	14,4 a	1,4	6,5
KO	2,1 a	13,9 a	1,8	9,0
ŁGK	2,8 b	13,9 a	1,4	6,5
CZ	2,8 b	14,3 a	1,6	6,5
PP	3,0 b	15,1 a	1,6	7,5
ŁN	2,6 b	12,8 a	1,8	7,0
T2	2,6 b	13,1 a	1,2	6,0
A	2,4 a	12,5 a	1,6	7,0
H	2,8 b	14,1 a	1,2	5,6

¹Szczepy *Bradyrhizobium* ²Liczby w kolumnach z taką samą literą nie różnią się istotnie ($\alpha=0,05$); * sucha masa roślin w fazie kwitnienia

W przeciwieństwie do rizobiów łubinu gleba ta zawierała bardzo mało bakterii symbiotycznych soi i dlatego intensywność brodawkowania na korzeniach omawianej rośliny w obiekcie kontrolnym, czyli bez przedsięwzięcia szczepienia nasion, była niska (tab. 2) i charakteryzowała się ona występowaniem tylko pojedynczych brodawek symbiotycznych na systemach korzeniowych obydwu badanych odmian soi. Wyniki doświadczenia wazonowego z soją, przedstawione w tab. 2, wyraźnie wskazują, że wszystkie szczepy *Bradyrhizobium japonicum* – symbionty soi – bardzo istotnie zwiększyły intensywność brodawkowania, chociaż niektóre izolaty były mniej efektywne pod tym względem. W tab. 2 przedstawiono tylko plon nasion w przeliczeniu na wazon, ale wszystkie oznaczane parametry wzrostu i plonowania roślin soi szczepionej rizobiami, czyli liczba nasion i strąków w przeliczeniu na 1 roślinę

oraz plon nasion soi w przeliczeniu na roślinę były istotnie wyższe niż soi bez szczepionki rizobiowych.

Wyniki uzyskane w niniejszych badaniach wyraźnie wskazują na potrzebę przedsięwzięcia otoczkowania nasion soi szczepionką zawierającą bakterie symbiotyczne tej rośliny. Gleby w naszym kraju nie zasiedlone są na ogół przez omawiane bakterie lub ich liczebności są zbyt małe, aby powstała w pełni efektywna symbioza [4, 5]. Tak właśnie było w przypadku gleby użytej do doświadczenia wazonowego. Nieliczne brodawki na korzeniach soi nie szczepionej (rys. 1) świadczą o zbyt małej liczebności bakterii symbiotycznych w tej glebie, co w efekcie ograniczało wzrost i plonowanie roślin soi. Zaszczepienie nasion bakteriami symbiotycznymi wyraźnie zwiększało liczbę brodawek na korzeniach soi, zwłaszcza w ich górnej części, oraz istotnie polepszało wzrost i plonowanie roślin (tab. 2, rys. 1).

Tab. 2. Intensywność brodawkowania i plony nasion dwóch odmian soi (Aldana i Nawiko) szczepionych różnymi szczepami bakterii symbiotycznych *Bradyrhizobium japonicum*
 Table 2. Nodulation intensity and seed yields of two soybean cultivars (Aldana and Nawiko) inoculated with different strains of symbiotic bacteria *Bradyrhizobium japonicum*

Obiekty Treatments	Odmiana / Cultivar Aldana		Odmiana / Cultivar Nawiko	
	Intensywność brodawkowania Nodulation intensity	Masa nasion (g wazon ⁻¹) Seed weight (g)/pot	Intensywność brodawkowania Nodulation intensity	Masa nasion (g wazon ⁻¹) Seed weight (g)/pot
Nasiona nieszczepione Uninoculated seeds	1,2 a ²	17,9 a	1,0 a	16 a
Nasiona szczepione ¹ : Seeds inoculated:				
138 ¹	2,2 b	23,0 b	2,8 c	26,2 c
94p	3,0 c	30,3 c	2,4 c	24,0 b
78B	3,0 c	30,4 c	2,7 c	23,8 b
CB82	3,0 c	31,0 c	2,8 c	24,2 b
L	3,0 c	30,0 c	2,8 c	29,5 c
PO	2,8 c	26,9 b	2,6 c	22,4 b
PR	3,0 c	31,4 c	3,0 c	28,3 c
110	2,3 b	26,6 b	2,0 b	18,8 b
KR	2,2 b	23,4 b	2,6 c	27,3 c
2	2,4 b	27,3 b	3,0 c	29,2 c

¹Szczepy *Bradyrhizobium* ²Liczby w kolumnach z taką samą literą nie różnią się istotnie ($\alpha=0,05$)

Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że przedsięwzięcie szczepienia nasion soi bakteriami symbiotycznymi jest ważnym zabiegiem, korzystnie wpływającym na symbiozę, wzrost i plonowanie soi. Brodawki na korzeniach roślin wyrosłych z zaszczerpionych nasion zgrupowane były wyraźnie w górnej części systemu korzeniowego. Dlatego w dalszych doświadczeniach z wybranymi, najefektywniejszymi szczepami *B. japonicum*, badane będą również szczepionki stosowane doglebowo, w redliny podczas siewu nasion. Być może przyczyni się to do powstawania brodawek także na niższych partiach systemu korzeniowego i w efekcie do uzyskiwania jeszcze większych przyrostów plonów nasion soi.

4. Bibliografia

- [1] Bashan Y.: Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.*, 1998, 16, 729-770.
- [2] Gołębiowska J., Sypniewska U.: The effect of the plant and of ecological conditions on development of symbiosis between lupine and *Rhizobium lupini*. *Acta Microbiologia Polonica*, 1962, 11, 319-328.
- [3] Graham P.H., Vance C.P.: Legumes: importance and constraints to greater use. *Pl. Physiol.*, 2003, 131, 872-877.
- [4] Książak J.: Regionalne zróżnicowanie produkcji pasz objętościowych w Polsce. *Pam. Puł.*, 2008, 147, 151-164.
- [5] Martyniuk S., Oroń J., Martyniuk M.: Diversity and numbers of root-nodule bacteria (rhizobia) in Polish soils. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 2005, 74(1), 83-86.
- [6] Martyniuk S.: Naukowe i praktyczne aspekty symbiozy roślin strączkowych z bakteriami brodawkowymi. *Pol. J. Agron.*, 2012, 9, 17-22.
- [7] Podleśny J., Brzóska F.: Uprawa łubinu żółtego na nasiona i wykorzystanie ich w żywieniu zwierząt. Instrukcja upowszechnieniowa IUNG-PIB, 2001, 76/01, 35 ss.
- [8] Strzelec A.: Symbiotyczne wiązanie azotu. I. Znaczenie bakterii symbiotycznych, ich występowanie w glebach i szczepionki *Rhizobium* dla roślin motylkowatych. *Post. Nauk Roln.*, 1988, 4(88), 17-30.
- [9] Thies J.E., Singleton P.W., Bohlool B.B.: Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Appl. Environm. Microbiol.*, 1991, 57, 19-28.
- [10] Thompson J.A.: Legume inoculant production and control. W: *FAO Raport*, Rome, Italy, 1991.
- [11] Vincent J.M.: A manual for practical study of root-nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1970, 164 pp.