

KOINOKULACJA *IN VITRO* SIEWEK KUKURYDZY BAKTERIAMI DIAZOTROFICZNYMI

**Justyna KLAMA, Alicja NIEWIADOMSKA,
Agnieszka WOLNA-MARUWKA**

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Mikrobiologii Rolnej

Słowa kluczowe: Azospirillum, diazotrofy, koinokulacja, kukurydza, Rhizobium

Streszczenie

Wiele prac badawczych potwierdza korzystny wpływ preparatów mikrobiologicznych na rozwój roślin. W wielu krajach odnotowano pozytywne efekty szczepienia roślin diazotroficznymi bakteriami endofitycznymi na poziom związanego przez nie azotu oraz wpływu na kondycję roślin. W ostatnich latach efektywnym zabiegiem okazała się koinokulacja roślin różnymi szczepami bakterii. Celem badań prezentowanych w pracy było przedstawienie wpływu szczepienia kukurydzy bakteriami diazotroficznymi: *Rhizobium leguminosarum* odmiany *trifolii* oraz *Rhizobium leguminosarum* odmiany *phaseoli* i *Azospirillum dobereineriae*. Przeprowadzone badania miały na celu określenie wpływu łącznego zastosowania obu szczepów na kondycję i rozwój badanej rośliny oraz poziom związanego przez nie azotu. Efekt wiązania azotu przez użyte w doświadczeniu szczepy bakterii był niewielki, niezależnie od rodzaju użytych do szczepienia mikroorganizmów. Stwierdzono natomiast różnice indeksu zieloności liścia oraz stopnia zasiedlenia korzeni przez mikroorganizmy, w zależności od zastosowanego rodzaju szczepienia kukurydzy.

WSTĘP

Kukurydza jest rośliną intensywnej uprawy, o dużych wymaganiach pokarmowych i nawozowych, w uprawie której wszelkie ograniczenia w dostarczeniu składników pokarmowych prowadzą do zmniejszenia plonu. Nowoczesne zasady nawożenia kukurydzy powinny uwzględniać dokładne dawki, gwarantujące pełne odżywienie roślin i ich wysokie plonowanie, z jednoczesną dbałością o środowisko

[DUBAS, 1980; HRYNCEWICZ, 1992]. W świetle tych faktów nie bez znaczenia wydaje się poszukiwanie nowych, skutecznych metod ograniczenia intensyfikacji nawożenia roślin. Jednym ze skutecznych sposobów może być wykorzystanie zdolności wybranych grup drobnoustrojów do aktywnego wiązania azotu atmosferycznego. Mimo znanego powszechnie powinowactwa wybranych gatunków diazotrofów i określonych gatunków roślin, wciąż niewiele wiadomo o roli współdziałania różnych grup drobnoustrojów, przyczyniających się do skutecznej infekcji roślin.

Celem badań prezentowanych w pracy było określenie wpływu koinokulacji siewek kukurydzy szczepami diazotroficznymi *Rhizobium leguminosarum* odmiany *phaseoli* oraz *trifolii* z *Azospirillum doebereinaerae* na kondycję roślin oraz poziom związanego przez nie azotu.

METODY BADAŃ

W przeprowadzonych badaniach z wykorzystaniem doświadczeń laboratoryjnych wykorzystano nasiona kukurydzy (*Zea mays*) odmiany Claudia, pochodzące z Katedry Uprawy Roli i Roślin UP w Poznaniu. Doświadczenie przeprowadzono na roślinach wzrastających w probówkach z pożywką Schenk&Hilderbrandt Medium [SCHENK, HILDERBRANDT, 1972], zamkniętych bawełnianymi korkami, które umożliwiają dobrą wymianę gazową [SOMASEGARAN, HOBEN, 1994]. Do inokulacji użyto szczepów bakterii *Azospirillum doebereinaerae* 13131 z Niemieckiej Kolekcji Mikroorganizmów i Kultur Komórkowych w Brunzshwiku, *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* C 37 oraz *bv. phaseoli* F11, pochodzące z Katedry Mikrobiologii Rolnej UP w Poznaniu.

Przed założeniem doświadczenia ziarniaki kukurydzy poddano sterylizacji, polegającej na płukaniu ich przez 5 minut w 70-procentowym roztworze alkoholu, a potem przez 2 minuty w 5-procentowej wodzie utlenionej. Następnie ziarniaki zostały pięciokrotnie przepłukane wodą destylowaną. Nasiona układano na wysterylizowane płytki Petriego wyścielane wysterylizowaną bibułą. Ziarniaki podlano jałową wodą i umieszczono w cieplarni w temperaturze 24°C do momentu kiełkowania. Podczas podkiełkowania nasion przygotowano bezazotową, agarową ($6-7 \text{ g} \cdot (100 \text{ cm}^3)^{-1}$) pożywkę wg Schenka i Hilderbrandta z sacharozą do rozwoju kukurydzy. Szczepy *Rhizobium* hodowano na podłożu YMA [SOMASEGARAN, HOBEN, 1994], natomiast *Azospirillum* na podłożu półpłynnym NFB [DÖBEREINER, MARRIEL, NERY, 1976].

Skiełkowane ziarniaki kukurydzy wprowadzano do probówek na przygotowane skosy. Następnie po 24 h rośliny szczepiono 0,1 ml zawiesiny trzydniowej hodowli szczepów bakterii wg niżej podanych kombinacji.

1. Kontrola (kukurydza nieszczepiona).
2. Inokulacja kukurydzy *Azospirillum doebereinaerae*.
3. Inokulacja kukurydzy *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii*.

4. Inokulacja kukurydzy *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*.
5. Koinokulacja *Azospirillum doebereineriae* i *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.
6. Koinokulacja *Azospirillum doebereineriae* i *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*.

Zaszczepione rośliny hodowano w kamerze wegetacyjnej w temperaturze 21°C, w 12-godzinym systemie naświetlania.

W przeprowadzonym doświadczeniu laboratoryjnym przedmiotem analiz były następujące parametry:

- aktywność nitrogenazy (mierzona w kombinacjach 2, 5. i 6.),
- indeks zieloności blaszek liściowych kukurydzy,
- liczebność wybranych grup drobnoustrojów zasiedlających korzenie rośliny.

Analizy wykonano w 5., 12., i 19. dniu od inokulacji. Aktywność nitrogenazy określano z użyciem chromatografu gazowego CHROM 5, na podstawie ilości zredukowanego acetyleny do etyleny i wyrażano w $\text{nmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{C}_2\text{H}_4$ w ciągu 1 godziny [SAWICKA, 1983].

Jednocześnie badano indeks zieloności blaszek liściowych siewek kukurydzy za pomocą chlorofilomierza (N-TESTER).

Do określenia liczebności bakterii materiałem wyjściowym była zawiesina otrzymana w wyniku rozmacerowania w moździerzu 1 g korzonków kukurydzy w 10 ml jałowej wody. Z tak przygotowanego materiału wykonano kolejne rozcieńczenia, które wysiano na podłoże stałe NFB, odpowiednie do rozwoju *Azospirillum*. Do oznaczenia liczebności *Rhizobium* zastosowano metodę płytek lanych wg Kocha.

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

AKTYWNOŚĆ NITROGENAZY

W okresie wzrostu kukurydzy (*Zea mays* L.) w wyniku przeprowadzonych trzykrotnie pomiarów aktywności nitrogenazy w kombinacjach 2., 5. i 6. w każdym z trzech terminów odnotowano jedynie śladowe ilości azotu związanego przez drobnoustroje, które nie stanowiły wymiernych danych.

Z badań przeprowadzonych w warunkach polowych i wazonowych w Izraelu i Niemczech wynika, że aktywność nitrogenazy w ryzosferze roślin zbożowych – mierzona metodą redukcji acetyleny – jest bardzo niska, prawie niewykrywalna [JAGNOW, 1987].

INDEKS ZIELONOŚCI BLASZEK LIŚCIOWYCH KUKURYDZY

Badania z tego zakresu przeprowadzono równoległe z określaniem aktywności nitrogenazy i liczebności drobnoustrojów zasiedlających tkankę korzeniową. Duże stężenie barwników chlorofilowych świadczy między innymi o stopniu pobierania azotu przez roślinę. Zanotowano różnice w zawartości barwników chlorofilowych w roślinach w zależności od zastosowanej kombinacji doświadczalnej i terminu pomiaru. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach 1. i 2.

Tabela 1. Średnia wartość indeksu zieloności blaszek liściowych siewek kukurydzy inokulowanych *Azospirillum dobereineriae* i *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

Table 1. Mean value of the leaf blades greenery index in maize seedlings inoculated with *Azospirillum dobereineriae* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

Termin analizy Time of analysis	Wartość indeksu zieloności (w jednostkach SPAD – wartości bezwzględne) na kombinacjach Greenery index (in SPAD units – absolute values) in treatments			
	kontrola control	<i>Azospirillum</i>	<i>Rhizobium</i>	koinokulacja co-inoculation (<i>Azospirillum</i> + <i>Rhizobium</i>)
5. dzień 5 th day	371	210	309	489
12. dzień 12 th day	207	219	197	249
19. dzień 19 th day	176	197	202	220

Tabela 2. Średnia wartość indeksu zieloności blaszek liściowych siewek kukurydzy inokulowanych *Azospirillum dobereineriae* i *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*

Table 2. Mean value of the leaf blades greenery index in maize seedlings inoculated with *Azospirillum dobereineriae* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*

Termin analizy Time of analysis	Wartość indeksu zieloności (w jednostkach SPAD – wartości bezwzględne) na kombinacjach Greenery index (in SPAD units – absolute values) in treatments			
	kontrola control	<i>Azospirillum</i>	<i>Rhizobium</i>	koinokulacja co-inoculation (<i>Azospirillum</i> + <i>Rhizobium</i>)
5. dzień 5 th day	382	213	249	274
12. dzień 12 th day	212	225	237	276
19. dzień 19 th day	197	199	137	223

Największą zawartość barwników chlorofilowych w siewkach kukurydzy odnotowano w pierwszym terminie pomiaru, ponadto rośliny odznaczały się bujniejszym wzrostem, wskazującym na lepszą kondycję fizjologiczną. W kolejnych terminach pomiarów stwierdzono, że zawartość chlorofilu systematycznie zmniejszała się we wszystkich kombinacjach, co zapewne było związane z postępującym

procesem wędnięcia roślin, wynikającym z coraz dłuższego czasu hodowli roślin w zamkniętych próbkach.

Porównując wartości indeksu zieloności liści kukurydzy inokulowanej różnymi szczepami bakterii, jednoznacznie można stwierdzić, że koinokulacja *Azospirillum* z *Rhizobium* znacząco wpłynęła na wzrost poziomu zieloności liści, a tym samym na poprawę kondycji rośliny. W wyniku koinokulacji szczepów *Azospirillum* i *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* stwierdzono najwyższy średni wskaźnik zieloności liści, wynoszący aż 489 jednostek SPAD. Podobnie pozytywny wpływ koinokulacji siewek odnotowano z zastosowaniem *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. Podobne, pozytywne rezultaty poprawy kondycji roślin zanotował ITZIGSHON [1993], koinokulując rośliny motylkowate *Rhizobium* z *Azospirillum* i uzyskując w efekcie koinokulacji zdecydowanie lepsze parametry wzrostu roślin.

We wszystkich trzech terminach pomiarów zaobserwowano różnice w koncentracji barwników chlorofilowych zarówno w siewkach szczepionych samym *Azospirillum*, jak i samym *Rhizobium*. Wyniki wskazują, że szczepienie siewek kukurydzy *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* wydaje się korzystniej wpływać na kondycję siewek, mimo że to *Azospirillum* jest endofitycznym szczepem dla tej rośliny. Średnia wartość zieloności liści z trzech pomiarów wynosi 209 jednostek SPAD w przypadku szczepienia *Azospirillum* i 236 jednostek w przypadku szczepienia *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. W przypadku zastosowania szczepu *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* nie zaobserwowano podobnej zależności. Mimo, że *Rhizobium* jest rodzajem typowo symbiotycznym dla roślin motylkowatych, to biochemiczny charakter wydzielin zewnątrzkomórkowych szczepu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* wpłynął, być może, stymulująco na kondycję siewek kukurydzy. Liczne badania potwierdzają bowiem korzystny wpływ fitohormonów z grupy auksyn i giberelin wydzielanych przez różne szczepy, które pobudzają wzrost i rozwój roślin [BURDMAN, SARIN, KIGEL, 1996; GŁOWACKA, 1990; STRZELCZYK, 2001]. Korzystny wpływ łącznego szczepienia bakteriami *Azospirillum* i *Rhizobium* roślin niemotylkowatych zanotowano również pod uprawą owsa i ryżu [CASTRO-SOWIŃSKI, MARTINEZ-DRETS, OKON, 2002].

LICZEBNOŚĆ *AZOSPIRILLUM* ZASIEDLAJĄCYCH KORZENIE ROŚLIN

Wyniki oznaczeń liczebności drobnoustrojów z rodzaju *Azospirillum* w tkance korzeniowej siewek kukurydzy szczepionych diazotroficznymi bakteriami przedstawiono w tabeli 3.

Liczebność szczepów *Azospirillum doebereinaerae* w tkankach korzeni kukurydzy była większa w przypadku koinokulacji z *Rhizobium leguminosarum* zarówno bv. *trifolii*, jak i bv. *phaseoli* niż w kombinacji z pojedynczą inokulacją wyłącznie szczepem *Azospirillum*.

Tabela 3. Średnia liczebność bakterii *Azospirillum* w koinokulacji z *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* oraz bv. *phaseoli* w tkance korzeniowej kukurydzy (*Zea mays* L.) w 19. dniu od inokulacji, $n \cdot 10^4$ jtk·g⁻¹ korzeni

Table 3. Mean number of *Azospirillum* bacteria in co-inoculation with *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and bv. *phaseoli* in root tissue of *Zea mays* L. on 19th day after inoculation, $n \cdot 10^4$ cfu·g⁻¹ of roots

Kontrola Control	Inokulacja Inoculation <i>Azospirillum</i>	Koinokulacja Co-inoculation <i>Azospirillum</i> + <i>Rhizobium</i>
W koinokulacji z <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> In co-inoculation with <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>		
0	214	254
W koinokulacji z <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> In co-inoculation with <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>		
0	178	194

Efekt ten można tłumaczyć zdolnością drobnoustrojów do syntetyzowania i wydzielania do środowiska większej ilości fitohormonów, które powodują rozrost włókników korzeniowych, a tym samym zwiększenie podatności rośliny na infekcję oraz rozwój tych bakterii endofitycznych [KRÓL, 2003]. Podobne rezultaty wykazano w badaniach BASHANA [1996] i CHEBOTARA, ASISA i AKAO [1993].

Powszechnie znanym zjawiskiem jest zdolność endofitów do produkcji hormonów wzrostu rośliny. Synteza fitohormonów przez bakterie z rodzaju *Azospirillum* jest niezbędna do wytwarzania trwałych asocjacji z korzeniami roślin [MICHIELS i in., 1989]. Hormony roślinne powodują poprawę kondycji rośliny przez podział i różnicowanie komórek w merystematycznej tkance korzenia, wskutek czego następuje wydłużanie się korzenia, zwiększenie liczby włókników i rozgałęzianie się ich [KRÓL, 2003]. Dlatego też najprawdopodobniej zwiększenie liczebności *Azospirillum* w tkance korzeniowej siewek kukurydzy podczas koinokulacji jest ściśle związane z polepszeniem kondycji rośliny w tej samej kombinacji, czego jednym z wyznaczników jest wzrost indeksu zieloności liści.

WNIOSKI

1. Koinokulacja siewek kukurydzy *Azospirillum doeberrinae* i *Rhizobium leguminosarum* nie wpłynęła na wzrost aktywności nitrogenazy, a tym samym na poziom wiązania azotu przez bakterie.

2. Łączne szczepienie siewek kukurydzy *Azospirillum doeberrinae* i *Rhizobium leguminosarum* polepsza kondycję rośliny, której jednym z wyznaczników jest wzrost wartości indeksu zieloności liści.

3. Obecność bakterii *Rhizobium* w środowisku wpływa stymulująco na proces zasiedlenia tkanki korzeniowej kukurydzy przez *Azospirillum*.

LITERATURA

- BASHAN A., 1999. Interaction of *Azospirillum* ssp. in soils: review. Biol. Fertil. Soils 29 s. 246–256.
- BURDMAN S., SARING S., KIGEL J., 1996. Field inoculation and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and chick pea (*Cicer arietinum* L.) with *Azospirillum brasilense* strain Cd. Symbiosis 24 s. 41–48.
- CASTRO-SOWIŃSKI S., MARTINEZ-DRETS G., OKON Y., 2002. Laccase activity in melanin-producing strains of *Sinorhizobium meliloti*. FEMS Microbiol. Lett. 209(1) s. 115–121.
- CHEBOTAR V.K., ASIS C., AKAO S., 2001. Production of growth – promoting substances and high colonization ability of rhizobacteria enhance the nitrogen fixation if soybean when coinoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. Biol. Fertil. Soils 34 s. 427–434.
- DÖBEREINER J., MARRIEL J.E., NERY M., 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Can. J. Microbiol. 22 s. 1464.
- DUBAS A., 1980. Kukurydza. Warszawa: PWRiL ss. 124.
- GŁOWACKA M., 1990. Możliwości symbiotycznego wiązania azotu. Post. Mikrobiol. 18 1 s. 12–14.
- HRYNCEWICZ B., 2002. Uprawa szczegółowa kukurydzy w warunkach klimatu umiarkowanego. Post. Nauk Rol. 12 s. 18–20.
- ITZIGSHON F., 1993. Strain specific chemotaxis of *Azospirillum* sp. J. Bacteriol. 162 s. 190–195.
- JAGNOW G.Z., 1987. Inoculation of cereal crops and forage grasses with nitrogen-fixing rizosphere bacteria: Possible causes of success and failure with regard to yield response – review. Z. Pflanzenernähr. Bodenkd. s. 150–361.
- KRÓL M.J., 2003. Interakcja *Azospirillum* z mikroorganizmami glebowymi. Post. Nauk Rol. 5 s. 3–9.
- MICHELIS K., TROCH P., ONYEOCHA I., GOOL A., ELMERICH C., VANDERLEYDEN J., 1989. Plasmid localization and mapping of two *Azospirillum brasilense* loci that affect exopolysaccharide synthesis. Plasmid 21 s. 140–148.
- SAWICKA A., 1983. Ekologiczne aspekty wiązania azotu atmosferycznego. Roczn. AR Pozn. Rozpr. Nauk. ss. 134.
- SCHENK R.U., HILDEBRANDT A.C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant – cell cultures. Can. J. Bot. 50 ss. 199.
- SOMASEGARAN P., HOBEN H.J., 1994. Handbook for Rhizobia. New York-Berlin-Heidelberg: Springer Verl. ss. 450.
- STRZELCZYK E. 2001. Endofity. Drobnoustroje środowiska glebowego – aspekty fizjologiczne, biochemiczne, genetyczne. Toruń: UMK ss. 60.

Justyna KLAMA, Alicja NIEWIADOMSKA, Agnieszka WOLNA-MARUWKA

IN VITRO CO-INOCULATION OF MAIZE SEEDLINGS WITH DIAZOTROPHIC BACTERIA

Key words: Azospirillum, co-inoculation, diazotrophs, maize, Rhizobium

S u m m a r y

Many research works confirm positive effects of plant treatment with microbiological preparations. The commonly known phenomenon of inoculation of legume plants with the nodule bacteria inoculum is widely applied in agricultural practise. In the recent years, studies have been intensified on the application of endophytic bacteria to economically important plants for the same purpose. In

many countries, positive effects have been recorded of the inoculation of plants with diazotrophic endophytic bacteria on plant condition and the amount of fixed nitrogen.

In the recent years, particular interest has been devoted to the application of plant inoculation with different bacterial strains. The objective of this study was to recognise the effect of maize inoculation with two varieties of diazotrophic bacteria *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* and *phaseoli* and with *Azospirillum dobereineriae*. The experiments were aimed to demonstrate the effect of the cumulated application of both strains on the development of studied plants and to determine the amount of fixed nitrogen.

Nitrogen fixation by bacterial strains used in the experiment was not high, irrespective of the type of microorganisms used for inoculation. Differences were, however, found in the leaf greenery index in relation to the applied inoculation of maize. Furthermore, the number of bacteria in the root tissue indicated significant differences in root colonisation by microorganisms.

Recenzenci:

doc. dr hab. Maria Król

prof. dr hab. Stefan Russel

Praca wpłynęła do Redakcji 14.09.2009 r.