

JUSTYNA KLAMA, AGNIESZKA WOLNA-MARUWKA, ALICJA NIEWIADOMSKA

Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

WPLYW KOINOKULACJI BAKTERIAMI DIAZOTROFICZNYMI NA ROZWÓJ SIEWEK PSZENICY ZWYCZAJNEJ

Streszczenie. W wielu krajach odnotowano pozytywne efekty szczepienia roślin diazotroficznymi bakteriami endofitycznymi na poziom związanego przez nie azotu oraz na ich kondycję. W ostatnich latach szczególnym zainteresowaniem cieszy się stosowanie koinokulacji roślin szczepionkami będącymi mieszaniną wielu wspomagających się szczepów bakterii. Przeprowadzone badania miały na celu określenie wpływu zastosowania szczepienia *Herbaspirillum frisingense*, *Azospirillum doebereinerae* oraz *Rhizobium leguminosarum* na kondycję pszenicy zwyczajnej. Stwierdzono różnice w indeksie zieloności liścia oraz w stopniu zasiedlenia korzeni przez mikroorganizmy w zależności od rodzaju szczepienia.

Słowa kluczowe: pszenica, koinokulacja, diazotrofy, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Rhizobium*

Wstęp

Wspomagające oddziaływania na siebie różnych gatunków drobnoustrojów zostały wielokrotnie udowodnione doświadczalnie. Na szczególną uwagę zasługuje symbiotyczny, synergistyczny wpływ bakterii endofitycznych na aktywność towarzyszących szczepów.

Zdrowe rośliny zawierają zespoły tzw. bakterii endofitycznych, dla których stanowią prawie niezbędną niszę.

Szereg najnowszych badań wydaje się potwierdzać hipotezę, że w świecie roślin nie występują gatunki, które byłyby pozbawione specyficznej mikroflory endofitycznej (STRZELCZYK 2001). Wydaje się, iż liczebność bakterii zależy od specyfiki niszy ekologicznej, różnic w drogach kolonizacji oraz mutacji genetycznych w obrębie populacji. Największą liczebność diazotrofów stwierdza się w korzeniach roślin i wynosi ona przeciętnie, jak podaje HALLMANN (2001), \log_5 jtk w 1 g świeżej masy roślin. Początkowo uważano, iż bakterie endofityczne jedynie stymulują rozwój roślin poprzez

produkcję fitohormonów (RASUL i IN. 1996). Później jednak stwierdzono, że endofity częściowo zwalczają tubylczą mikroflorę, hamującą rozwój roślin (STRZELCZYK 2001). Ich rolę sprowadzano także do szeroko rozumianej kontroli biologicznej, dzięki wytwarzaniu substancji przeciwgrzybowych i przeciwbakteryjnych, sideroforów oraz konkurencji o pokarm (JEGER 2001). Odkryto również, że bakterie te zaopatrują rośliny w azot oraz wpływają na ich zdrowie poprzez wypieranie różnorodnych patogenów (HALLMANN 2001). Użycie bakterii endofitycznych w produkcji roślinnej zależy od zdolności człowieka do zachowania tych pożytecznych zespołów drobnoustrojów w warunkach naturalnych, do manipulowania nimi i ich modyfikowania. Dotychczas brak jest zadowalających informacji o strukturze zbiorowisk endofitów, ich głównych funkcjach, ekologicznej stabilności i czynnikach na nie wpływających. Uzyskanie tych informacji może przyczynić się do lepszego wykorzystania endofitów w praktyce rolniczej, ogrodniczej, sadowniczej i leśnej (STRZELCZYK 2001).

Obserwuje się często zjawisko synergistycznego działania bakterii endofitycznych i innych grup drobnoustrojów, prowadzące do spotęgowania ich aktywności biologicznej.

Celem niniejszej pracy było poznanie wpływu szczepienia pszenicy zwyczajnej bakteriami diazotroficznymi: *Herbaspirillum frisingense*, *Azospirillum doebereinerae* i *Rhizobium leguminosarum* w odmianie *trifolii*. Przeprowadzone badania miały na celu określenie wzajemnych związków między testowanymi szczepami oraz ich wpływu na kondycję i rozwój pszenicy zwyczajnej.

Material i metody

W doświadczeniach laboratoryjnych wykorzystano nasiona pszenicy zwyczajnej odmiany 'Kris', pochodzące z Katedry Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Doświadczenie przeprowadzono na roślinach wzrastających w probówkach z pożywką według SCHENKA i HILDEBRANDTA (1972), zamkniętych bawełnianymi korkami, które umożliwiają dobrą wymianę gazową. Do inokulacji użyto szczepów bakterii *Herbaspirillum frisingense* 13130 i *Azospirillum doebereinerae* 13131 pochodzących z Niemieckiej Kolekcji Mikroorganizmów i Kultur Komórkowych (DSMZ) w Brunszwiku oraz *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* C 37 z Katedry Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej UP w Poznaniu.

Przed założeniem doświadczenia ziarniaki pszenicy zostały poddane sterylizacji, polegającej na płukaniu ich przez 5 min w 70-procentowym roztworze alkoholu, potem przez 2 min w 5-procentowym roztworze wody utlenionej, a następnie kilkakrotnym przepłukiwaniu jałową wodą destylowaną. Nasiona układano na wysterylizowane płytki Petriego wyścielane wysterylizowaną bibułą. Podlano je jałową wodą i umieszczono w cieplarni w temperaturze 24°C do momentu skielkowania. Szczepy *Rhizobium* hodowano na podłożu YMA, *Azospirillum* – na podłożu DAS, *Herbaspirillum* – na podłożu proponowanym przez Niemiecką Kolekcję Mikroorganizmów i Kultur Komórkowych w Brunszwiku (pepton 5 g/l, ekstrakt mięsny 3 g/l, agar 18 g/l wody).

Skielkowane ziarniaki pszenicy wprowadzano do probówek na przygotowane skosy, zapewniające prawidłowy wzrost i rozwój roślin. Po upływie 24 h rośliny szczepiono zawiesiną trzydniowych szczepów bakterii w ilości 0,1 ml odpowiedniego inokulum według następujących kombinacji:

- kontrola (pszenica nieszczepiona),
- inokulacja pszenicy *Herbaspirillum frisingense*,
- inokulacja pszenicy *Azospirillum doebereinerae*,
- inokulacja pszenicy *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*,
- koinokulacja: *Herbaspirillum frisingense* i *Azospirillum doebereinerae*,
- koinokulacja: *Herbaspirillum frisingense* i *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*,
- koinokulacja: *Azospirillum doebereinerae* i *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.

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

W przeprowadzonym doświadczeniu laboratoryjnym przedmiotem analiz były następujące parametry:

- 1) indeks zieloności blaszek liściowych pszenicy,
- 2) liczebność wybranych grup drobnoustrojów zasiedlających korzenie rośliny.

Analizy wykonano po upływie 5, 12 i 19 dni od inokulacji.

Indeks zieloności blaszek liściowych siewek pszenicy badano za pomocą chlorofilomierza (N-Tester).

Do określenia liczebności bakterii z rodzajów *Herbaspirillum*, *Azospirillum* i *Rhizobium* zastosowano metodę płytek lanych według Kocha. Materiałem wyjściowym była zawiesina otrzymana w wyniku rozmacerowania w mózdzierzu w 5 ml jałowej wody korzonków pszenicy. Z tak przygotowanego materiału wykonano szereg kolejnych rozcieńczeń, które wysiano na odpowiednie podłoża: peptonowe (DSMZ) – dla rozwoju *Herbaspirillum*, DAS dla rozwoju *Azospirillum* i YMA – dla rozwoju *Rhizobium*.

Wyniki i dyskusja

Określenie indeksu zieloności blaszek liściowych pszenicy zwyczajnej

Indeks zieloności blaszek liściowych pszenicy badano równolegle z określaniem aktywności nitrogenazy i liczebności drobnoustrojów zasiedlających tkankę korzeniową. Stężenie chlorofilu świadczy m.in. o stopniu pokrycia zapotrzebowania na azot. Zano-towano różnice w zawartości chlorofilu w roślinach w zależności od zastosowanej kombinacji doświadczalnej i terminu pomiaru. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Stwierdzono istotne różnice w zawartości barwnika w zależności od zastosowanego rodzaju szczepienia pszenicy zwyczajnej. Najniższy poziom chlorofilu odnotowano w terminie pierwszym, czyli po pięciu dniach od zaszczepienia pszenicy bakteriami diazotroficznymi, we wszystkich kombinacjach doświadczalnych. Największa koncentracja barwnika w blaszkach liściowych wystąpiła po 19 dniach od inokulacji roślin, co najprawdopodobniej było związane rozwojem siewek pszenicy.

W dwóch pierwszych terminach pomiaru wysoki poziom koncentracji barwnika uzyskano w kombinacji pojedynczego szczepienia nasion *Rhizobium trifolii*; wynosił on 162 i 158,4 jednostki SPAD. W trzecim terminie pomiaru najlepszy efekt dało łączne szczepienie *Herbaspirillum* + *Azospirillum*: 253,4 jednostki SPAD, co świadczy o pozytywnym wpływie koinokulacji bakteriami endofitycznymi na kondycję pszenicy

Tabela 1. Koncentracja chlorofilu w blaszkach liściowych pszenicy zwyczajnej
Table 1. Chlorophyll concentration in leaves of common wheat

Kombinacja doświadczalna	Indeks zieloności liścia (jednostki SPAD)		
	5 dni po inokulacji	12 dni po inokulacji	19 dni po inokulacji
Kontrola (rośliny nieinokulowane)	59 a	167,5 b	201 b
<i>Herbaspirillum</i>	80,2 b	98,6 a	163,6 a
<i>Azospirillum</i>	196,5	208 c	214,4
<i>Rhizobium</i>	162 c	158,4 b	155,5 a
<i>Herbaspirillum</i> + <i>Azospirillum</i>	219 d	248,5 c	253,4 c
<i>Herbaspirillum</i> + <i>Rhizobium</i>	93,6 b	118,2 a	181 b
<i>Azospirillum</i> + <i>Rhizobium</i>	124 b	178,3 b	232,1 c

Wartości w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie na poziomie prawdopodobieństwa $\alpha = 0,05$.

zwyczajnej. Również bardzo dobry wynik odnotowano w koinokulacji *Azospirillum* + *Rhizobium* (233,1 jednostki SPAD), co wskazuje na stymulujące oddziaływanie *Rhizobium* na *Azospirillum*. W przypadku roślin zaszczepionych szczepem *Rhizobium leguminosarum* w odmianie *trifolii* we wszystkich trzech terminach pomiaru, niezależnie od rozwoju siewek pszenicy, stwierdzono wyrównany poziom chlorofilu w blaszkach liściowych, który był większy o 28% niż w blaszkach roślin zaszczepionych wyłącznie *Herbaspirillum*.

Korzystny wpływ endofitów, stymulujący wzrost roślin, wynika często z wydzielania przez nie fitohormonów, enzymów celulolitycznych czy pektynolitycznych, sideroforów. Niewykluczone też, że na skutek kolonizacji korzeni sama roślina zostaje pobudzona przez endofity do produkcji substancji stymulujących jej rozwój (TIEN i IN. 1979). Wyniki niektórych badań potwierdzają również stymulujące współdziałanie endofitów i bakterii brodawkowych. W doświadczeniu, w którym szczepiono rośliny koniczyny białej *Rhizobium trifolii* i *Azospirillum lipoferum* o gęstości inokulatu 1:1, zaobserwowano trzykrotny wzrost brodawkowania oraz zwiększoną aktywność nitrogenazy w porównaniu z roślinami szczepionymi wyłącznie *Rhizobium* spp. W kombinacjach doświadczalnych, w których koniczyna była szczepiona wyłącznie *Azospirillum lipoferum*, szczep kolonizował stożek wzrostu korzenia oraz włośniki, natomiast u roślin po koinokulacji *Azospirillum* + *Rhizobium* zaobserwowano dodatkowe miejsca kolonizacji endofitu: na brodawkach korzeniowych i w ich pobliżu. Efekt ten można tłumaczyć zdolnością bakterii diazotroficznych z rodzaju *Azospirillum* do produkcji substancji biologicznie czynnych, które korzystnie wpływają na rozwój, wzrost oraz rozgałęzianie się włośników korzeniowych czy powiększanie się liczby brodawek (ITZIGSHON 1993). W wyniku takiego działania roślina staje się bardziej podatna na infekcje *Rhizobium*, a także na rozwój populacji bakterii symbiotycznych w tej kombinacji doświadczalnej (TCHEBOTAR i IN. 1998).

Dowodem na produkcję przez endofityczne bakterie fitohormonów było również szczepienie nasion soi szczepem *Pseudomonas fluorescens*, który powodował wzrost

infekcji roślin *Bradyrhizobium japonicum*, zwiększenie liczby brodawek w korzeniach soi oraz zwiększenie aktywności nitrogenazy (AKAO i IN. 2001).

Wzmocniona podatność roślin na zakażenie bakteriami brodawkowatymi, a tym samym zwiększenie szansy nodulacji w obecności endofitów, tłumaczy się stymulacją dużej liczby komórek epidermalnych hormonami wytwarzanymi przez te gatunki bakterii (KRÓL 2003).

Stwierdzono ponadto, że łączne szczepienie *Azospirillum brasilense* i *Rhizobium meliloti* wpływało istotnie na wzrost trzytygodniowych siewek owsa i ryżu (CASTRO-SOWIŃSKI i IN. 2002).

Określenie liczebności *Azospirillum* i *Herbaspirillum* zasiedlających korzenie roślin

Największą zdolność kolonizacji tkanek korzenia przez bakterie zanotowano w koinokulacji pszenicy zwyczajnej *Azospirillum doebereinerae* i *Rhizobium leguminosarum*. Ilość bakterii diazotroficznymi w tej kombinacji doświadczalnej wynosiła 213×10^2 jtk. Podobne efekty współdziałania odmiennych szczepów zaobserwowano w intensywności brodawkowania koniczyny białej i w aktywności nitrogenazy w zależności od gęstości inokulatu oraz czasu zaszczepiania roślin *Rhizobium leguminosarum* w odmianie *trifolii* i *Azospirillum* spp. Stymulujące brodawkowanie odnotowano, gdy roślina była inokulowana *Rhizobium trifolii*, a po 24 h – *Azospirillum* spp. (PLAZIŃSKI i ROLFE 1985).

W przypadku pojedynczego szczepienia nasion pszenicy szczepami endofitycznymi większa liczebność drobnoustrojów wewnątrz korzenia wystąpiła po inokulacji rośliny *Azospirillum*: 89×10^2 jtk (tab. 2).

Tabela 2. Liczebność analizowanych bakterii w tkance korzeniowej inokulowanej i koinokulowanej pszenicy zwyczajnej 19 dni po inokulacji

Table 2. Number of analysed bacteria in root tissue of common wheat inoculated and coinoculated 19 days after inoculation

Kombinacja doświadczalna	$\times 10^2$ jtk w 1 g korzeni
Kontrola (rośliny nieinokulowane)	0
<i>Herbaspirillum</i>	49 a
<i>Azospirillum</i>	89 b
<i>Herbaspirillum</i> + <i>Azospirillum</i>	149 c
<i>Herbaspirillum</i> + <i>Rhizobium</i>	105 b
<i>Azospirillum</i> + <i>Rhizobium</i>	213 d

Wartości w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie na poziomie prawdopodobieństwa $\alpha = 0,05$.

Powszechnie znanym zjawiskiem jest zdolność endofitów do produkcji hormonów wzrostu rośliny. Synteza fitohormonów przez bakterie z rodzaju *Azospirillum* jest niezbędna do wytwarzania trwałych połączeń z korzeniami roślin, co może tłumaczyć uzyskany wynik.

Podsumowanie

Bakterie *Azospirillum* i *Herbaspirillum* są zdolne do zasiedlania korzeni roślin pszenicy zwyczajnej. Najlepszy efekt kolonizacji uzyskano w wyniku łącznego szczepienia bakteriami *Azospirillum* i *Rhizobium*.

Współdziałanie szczepów *Rhizobium* z *Herbaspirillum* i *Azospirillum* wpływa stymulująco na kondycję roślin, o czym świadczy największa w końcowym etapie rozwoju siewek zawartość chlorofilu w blaszkach liściowych pszenicy.

Literatura

- AKAO S., TCHEBOTAR V.K., ASIS C.A., 2001. Production of growth-promoting substances and high colonization ability of rhizobacteria enhance the nitrogen fixation of soybean when coinoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. *Biol. Fertil. Soils* 34: 427-432.
- CASTRO-SOWIŃSKI S., MARTINEZ-DRETS G., OKON Y., 2002. Lactase activity in melani-producing strains of *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol. Lett.* 209, 1: 115-121.
- HALLMANN J., 2001. Plant interactions with endophytic bacteria. W: Biotic interactions in plant-pathogen associations. Red. M.J. Jeger, N.J. Spence. CABI, UK: 87-114.
- ITZIGSHON R., 1993. Strain specific chemotaxis of *Azospirillum* sp. *J. Bacteriol.* 162, 4: 190-195.
- JEGER M.J., 2001. Biotic interactions and plant-pathogen associations. W: Biotic interactions in plant-pathogen associations. Red. M.J. Jeger, N.J. Spence. CABI, UK: 1-14.
- KRÓL M.J., 2003. Interakcja *Azospirillum* z mikroorganizmami glebowymi. *Post. Nauk Roln.* 5: 3-9.
- PLAZIŃSKI J., ROLFE B.G., 1985. Influence of *Azospirillum* strains on the nodulation of clovers by *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 4: 984-989.
- RASUL G., MIRZA M.S., LATIF F., MALIK K.A., 1996. Identification of plant growth hormones produced by bacterial isolates from rice and wheat. W: Proceedings of the 7th Symposium of Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives. Red. P.M. Gresshoff, L.E. Roth. New York: 688.
- 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: 199.
- STRZELCZYK E., 2001. Endofity. W: Drobnoustroje środowiska glebowego, aspekty fizjologiczne, biochemiczne, genetyczne. Red. H. Dahm, A. Pokojska-Burdziej. Marszałek, Toruń: 97-107.
- TCHEBOTAR V.K., KANG U.G., ASIS C.A., AKAO S., 1998. The use of GUS-reporter gene to study the effect of *Azospirillum-Rhizobium* coinoculation on nodulation of white clover. *Biol. Fertil. Soils* 27, 4: 349-352.
- TIEN T.U., GASKINS U.H., HUBBELL D.H., 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on growth of pearl millet. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 5: 1016-1024.

INFLUENCE OF ENDOPHYTIC BACTERIA COINOCULATION ON SEEDLINGS OF COMMON WHEAT DEVELOPMENT

Summary. In many countries a beneficial effect has been observed of inoculation with endophytic bacteria on nitrogen fixation level and on plant condition. During last years, plant inoculation

Klama J., Wolna-Maruwka A., Niewiadomska A., 2010. Wpływ koinokulacji bakteriami diazotroficznymi na rozwój siewek pszenicy zwyczajnej. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 6, #83.

with inoculum containing various and numerous helpful bacteria species has been applied in many experiments. The aim of the conducted experiment was determination of the influence of coinoculation of *Herbaspirillum frisingense*, *Azospirillum doebereinerae* and *Rhizobium leguminosarum* on their ability to fix oxygen and on wheat condition. The level of nitrogen fixation was very low, independently of the applied microorganisms. Differences in leaves greenness, index and level of colonisation by microorganisms, depending on the kind of combination, were observed.

Key words: wheat, coinoculation, diazotrophs, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Rhizobium*

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Justyna Klama, Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Szydlowska 50, 60-656 Poznań, Poland, e-mail: jklama@up.poznan.pl

Zaakceptowano do druku – Accepted for print:

18.10.2010

Do cytowania – For citation:

*Klama J., Wolna-Maruwka A., Niewiadomska A., 2010. Wpływ koinokulacji bakteriami diazotroficznymi na rozwój siewek pszenicy zwyczajnej. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 6, #83.*