

CZU 631.461.5

TESTAREA UNOR TULPINI NOI DE *RHIZOBIUM JAPONICUM* PENTRU FIXAREA SIMBIOTROFĂ A AZOTULUI ATMOSFERIC

V. SAMOIL, TATIANA MOHOVA, L. ONOFRAȘ,
V. TODIRAȘ, SVETLANA PRISACARI
Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

Abstract. From thirty four strains of *Rhizobium japonicum*, in field conditions and in symbiosis with soybean (*Glycine max.* variety Bucuria), three best strains have been selected and tested. The selected strains were compared with three control lots and showed good nodule formation rate and increased dry matter of the plant. Using GC methods, it was appreciated the potential capacity to fix atmospheric nitrogen for nodule and rhizospheric soils. It was revealed that a new selected strain have the same nitrogen fixing capacity like a standard strain but it stimulates better plant growth and development.

Keywords: Bacterial strains, Efficiency, Nitrogen fixation, *Rhizobium japonicum*, Soybean.

INTRODUCERE

Fixarea biologică a azotului (N_2) este un fenomen eficient și ecologic de restabilire naturală a fertilității solului (D. Diaga, 2003; T. Franciska, 2006). Conform estimărilor diferitor autori cantitatea de azot care poate fi stocată în sol de către bacteriile simbiotrofe poate varia de la 139 la 175 mln. tone N/an (A. Sessitsch, 2004). Astfel asociațiile simbiotice utilizate în practica agricolă pot fixa 35-44 mln. tone de N/an, pășunile permanente - 45 mln. tone N/an, iar o parte de azot este fixat de către microflora oceanului planetar.

În Moldova sunt cultivate peste 200 de specii și soiuri de plante și culturi leguminoase pe rădăcinile cărora se formează nodozități (A. Donos, 2006). Cantitatea de azot fixată de sistemul simbiotrof *Rhizobium sp.*/lucernă sau *Rhizobium sp.*/lupin poate varia între 35 și 160 kg N/ha/an. Pentru alte culturi cum sunt soia, vicia, mazărea, cantitatea de azot reintrodusă în sol a fost estimată la aproximativ 20-135 kg N/ha/an (R. Tate, 1995). În același timp fixarea azotului atmosferic de către simbioza *Rhizobium sp.*/soia, este limitată în timp la 20-40 zile și este substanțial influențată de multipli factori, cum ar fi: durata zilei și fluctuațiile termice diurne, alegerea corectă a perechii soi/tulpină bacteriană, adâncimea la care se formează nodozitățile pe rădăcinile plantelor, asigurarea solului cu microelemente și accesibilitatea acestora pentru plante (B. Mishra, 1976).

În procesul de selectare a tulpinilor eficiente de *Rhizobium sp.* pentru bacterizarea semințelor de soia, unii cercetători recomandă de a lua în considerație numărul de nodozități formate, masa uscată a nodozităților, masa uscată a plantelor, conținutul de leghemoglobină și de azot în nodozități, conținutul de azot în masa verde (T. Franciska, 2006). Alții recomandă de a ține cont de parametrii biometrici ai plantelor pe parcursul perioadei de vegetație și de intensitatea proceselor de azotfixare în anumite perioade ale zilei (M. Obaton, 2002).

MATERIAL ȘI METODĂ

Experimentele au fost montate pe câmpul Bazei Experimentale a Secției de Biologie, Chimie și Ecologie a AȘM în trei repetiții, pe un teren de 10m × 17m. În calitate de plantă-test a servit soiul de soia Bucuria, trei tulpini de bacterii *Rhizobium japonicum* (OcR1, RD2, RR2), iar în calitate de martori au servit: semințe uscate (M1), semințe tratate cu apă (M2) și semințe tratate cu tulpina standard 646.

Datele experimentale au fost colectate la două faze de dezvoltare a plantei. În prima fază de înflorire a fost colectat material vegetal pentru analize biometrice și de testare a capacității de azotfixare. În faza a doua, de coacere completă a păstăii, au fost efectuate măsurări biometrice (O. Beresteckii, 1979).

Analizele gaz-cromatografice au fost realizate la cromatograful gaz-lichid Crom-5, dotat cu coloana de sticlă umplută cu fază staționară tip Separon 100, lungimea coloanei – 1 m, gaz purtător – heliu. Recalcularea cantității de azot potențial fixat de către o plantă a fost efectuată conform metodei Beresteckii (1982).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din diverse zone pedo-climaterice ale Moldovei, din nodozitățile plantelor de soia, au fost izolate și testate în condiții de laborator treizeci și patru de tulpini de bacterii *Rhizobium japonicum*. În rezultatul investigațiilor de laborator și în conformitate cu recomandările expuse mai sus, au fost selectate trei tulpini care au fost codificate după cum urmează: OcR1 – r-nul Ocnița; RD2 – r-nul Râșcani, s. Petroșani; RR2 – r-nul Râșcani, s. Recea.

Conform datelor obținute pe parcursul investigațiilor, cele mai înalte sau dovedit a fi plantele rădăcinile cărora au fost inoculate cu tulpina RD2 – 46 cm (tab. 1), după care urmează plantele bacterizate cu tulpina standard 646 – 45,7 cm. Martorul M1 și RR2 au avut o înălțime asemănătoare - câte 45 și 45,2 cm respectiv. Puțin mai joase au fost plantele bacterizate cu tulpina OcR1. Statistic cele mai joase s-au dovedit a fi plantele martorului M2.

Despre eficacitatea tulpinilor de bacterii deseori se judecă după masa uscată acumulată de plante. În acest context s-a stabilit că cea mai mare masă uscată a fost acumulată de către plantele bacterizate cu tulpina RR2 – 7,76 g, urmată de martorul M1 – 7,1 g. Masa uscată acumulată de către plantele bacterizate cu tulpina standard 646 a fost 5,63 g (substanțial mai puțin decât RR2), urmate de plantele bacterizate cu tulpina RD2, M2 și OcR1 cu masa brută de 5,52; 5,43 și 5,38 g respectiv.

În a doua fază a fost analizată masa plantei fără păstăi. Masa maximală acumulată în acest caz este a martorului M1 – 3,85 g, urmată de tulpina standard 646 – 3,74 g. Tulpinile RR2, RD2 și OcR1 au acumulat mase respective de 3,56; 3,40 și 3,48 g. Cea mai mică masă a fost acumulată de martorul M2 – 2,97 g.

Acumularea carbonului în sol, este un indice de acumulare/activizare a proceselor de humificare. De aceea a fost analizată masa umedă și uscată a rădăcinilor ce rămân în sol (la adâncimea 0-20 cm) după colectarea roadei (tab. 1).

Cea mai mare masă radiculară a fost înregistrată la plantele bacterizate cu tulpinile RR2- 4,09 g, urmată de martor M1 – 3,66 și tulpina standard 646 – 3,46 g. Martorul M2 a avut o masă de 3,47 g. Cea mai mica masa umedă au acumulat-o plantele bacterizate cu tulpinile OcR1 și RD2 (câte 3,14 g fiecare). După uscarea rădăcinilor cea mai mare masă au avut-o plantele bacterizate cu tulpina RR2 – 1,87 g, urmate de martorul M1 – 1,85 g. La celelalte variante masa radiculară uscată a fost substanțial mai mică, tulpina 646 – 1,64 g, tulpina OcR1 – 1,56 g, M2 – 1,49 și RD2 – 1,46 g.

În cadrul cercetărilor au fost numărate nodozitățile de pe rădăcinile plantelor luate în studiu (tab. 1). În medie cele mai multe nodozități au fost observate pe rădăcinile bacterizate cu tulpina RR2 (12 nodozități), iar cele mai puține nodozități (8), pe rădăcinile plantelor martor M2. Tulpinile standard 646 și RD2 au format câte 11 nodozități, iar M1 și OcR1 au format câte 10 nodozități. În toate variantele mărimea nodozităților a fost foarte diferită și varia de la mare (d = 3 mm) la mic (d = 0,5 mm). Spre deosebire de experimentele efectuate în condiții de laborator nodozități foarte mici nu au fost observate.

Rezultatele măsurărilor plantelor de soia în prima fază a experimentului
(M-media; SD – abaterea medie standard)

Varianta	Număr de plante, buc	Număr total de nodozități, buc.	Număr de nodozități per plantă, buc.		Înălțimea plantei, cm		Masa uscată a plantei, g		Masa uscată a rădăcinii, g		Masa uscată a plantei + rădăcină, g	
			M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
M1	27	198	9	8	41,32	3,78	7,10	2,69	2,16	0,44	9,26	3,13
M2	29	197	8	5	40,50	5,97	5,43	1,97	1,19	0,41	6,62	2,38
646	26	289	11	6	41,00	5,81	5,63	1,91	1,40	0,41	7,03	2,32
OcR1	27	280	10	5	40,72	5,25	5,38	2,23	1,67	0,80	7,05	3,04
RD2	27	306	11	4	39,95	6,67	5,52	2,33	1,50	0,35	7,02	2,68
RR2	28	348	12	6	44,35	5,81	7,76	1,92	1,97	0,37	9,73	2,29

Un indice important este dispersia statistică obținută după prelucrarea matematică a datelor. În variantele cu semințe bacterizate dispersia a fost nu mai mare de 5-6 bacterii per plantă. În varianta martor M1, deși media a fost 10 nodozități/plantă, dispersia indică că numărul de nodozități poate varia de la 1 la 20. Acest fapt demonstrează că a miza pe populațiile de bacterii spontane înseamnă de a avea un proces ineficient de saturație a solului cu azot, fapt ce contravine unei practici agricole unde eficiența trebuie să fie previzibilă. În același timp pe terenurile agricole unde nu au fost cultivată soia anterior, numărul de bacterii spontane poate fi în jur de 20 unități la 1 g de sol sau chiar poate lipsi în întregime (V. Patca, 2004). Însă pentru formarea unei nodozități pe rădăcina plantei este necesar ca în zona radiculară să se găsească o populație de cel puțin 500 unități de bacterii la 1 g sol (F. Kurdali, 2005).

Determinarea capacității de azotfixare a nodozităților, conform datelor din literatură, este rațional să fie evaluată în perioada de butonizare/înflorire a plantelor de soia, când activitatea complexului nitrogenazic înregistrează valori maxime. De aceea au fost selectate câte trei rădăcini cu nodozități din fiecare variantă, în trei repetiții, pentru analiza capacității de reducere a acetilenei de către complexul nitrogenazic bacterian.

Cea mai intensă capacitate de azotfixare (fig. 1) a fost evidențiată la complexul nitrogenazic din nodozitățile formate de tulpina 646 (89,94 mkgN/pl/oră).

Tulpina RD2 a avut o capacitate de azotfixare la nivelul de 81,32 mkgN/pl/oră, fiind urmată de bacteriile de nodozități din microflora spontană de pe martorul M2 care au manifestat o activitate de fixare în limita de 71 mkgN/pl/oră. Mai puțin intens funcționa complexul nitrogenazic din nodozitățile formate pe rădăcinile martorului 2 (M2) și tulpina OcR1, câte 63,74 și respectiv 66,53 mkgN/pl/oră. Cel mai puțin eficient s-a dovedit a fi complexul nitrogenazic al tulpinei RR2, cu doar numai 51 mkgN/pl/oră.

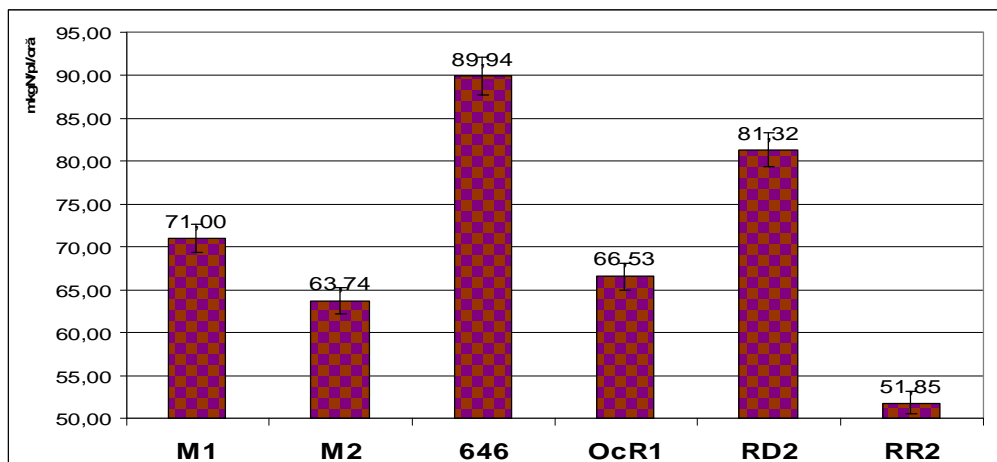


Fig. 1. Capacitatea potențială de fixare a azotului în nodozitățile de pe rădăcinile plantelor de soia în dependență de tulpinile luate în studiu

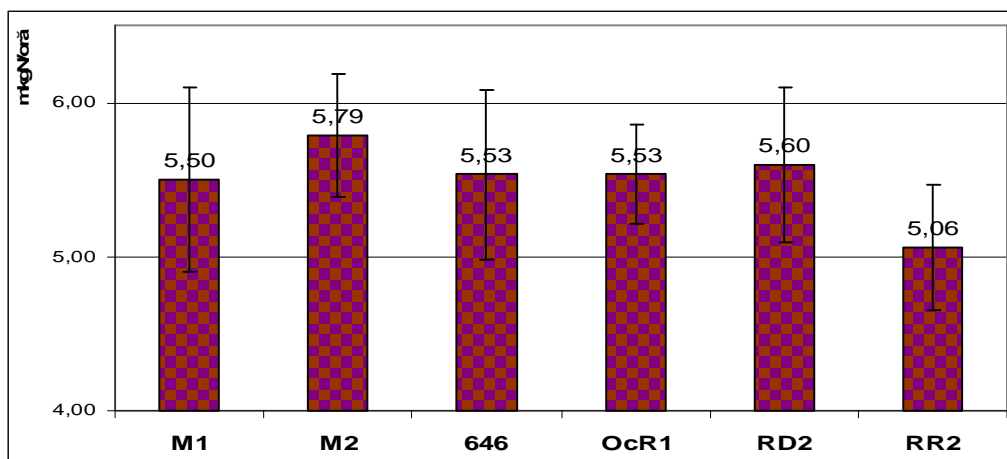


Fig. 2. Capacitatea maximă de fixare a azotului atmosferic de către populațiile microbiene din zona de rizosferă a rădăcinilor plantelor de soia bacterizate cu tulpini de *Rh. japonicum*

În aceeași perioadă a fost apreciată capacitatea de fixare a azotului de către microorganismele din solul zonei de rizosferă a plantelor de soia (fig. 2). De menționat că intensitatea proceselor de azotfixare în acest caz s-a deosebit nesemnificativ în cadrul variantelor luate în studiu. În varianta martor (M2), a fost observată cea mai mare intensitate de azotfixare, cea mai mică fiind în varianta RR2. În variantele M1, 646, OcR1 și RD2 eficacitatea procesului respectiv au fost asemănătoare.

CONCLUZII

După analiza completă a rezultatelor obținute și ținând cont de condițiile climaterice putem concludiona: din cele trei tulpini selectate în Moldova și experimentate în condiții de câmp, cea mai eficientă a fost tulpina *Rhizobium japonicum* RD2. Tulpinile OcR1 și RR2 după parametrii sumari au demonstrat un potențial de utilitate mai redus. Datele referitoare la capacitatea de fixare a azotului atmosferic scoate în evidență necesitatea de a izola și de a include în procesul de cercetare și alte tulpini de bacterii *Rhizobium japonicum*.

BIBLIOGRAFIE

1. DIAGA, D.; TAHIR, A.; IBRAHIMA, N. Actinorhizal, mycorrhizal and rhizobial symbioses: how much do we know? *African Journal of Biotechnology*, 2003, vol. 3, p.1-7.
2. DONOS, A. *Căile de acumulare a azotului*. Chișinău.: IEFS, 2006, 28 p.
3. FRANCISKA, T.; HOFFLAND, E.; VAN EEKEREN, N. et al. Fungal/bacterial ratios in grasslands with contrasting nitrogen management. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, vol. 36, p. 2092–2103.
4. KURDALI, F.; NABUSHI, I.; MIRALI, N. Nitrogen fixation in mutant soybean lines inoculated with two *Bradyrhizobium japonicum* strains. *Agrochimica*, 2005, vol. 49, Nr. 5-6, p. 233-245.
5. MISHRA, B.; SRIVASTAVA, L. Stadio nodulation, N fixation and rhizosphere effect of some soybean (*Glicine max* L.) varieties. *Indian Microbiol.*, 1978, vol. 18, nr. 2, p. 131-132.
6. OBATON, M.; BOUNIOLS, A.; PIVA, G. et al. Are *Bradyrhizobium japonicum* stable during a long stay in soil? *Plant and Soil*, 2002, vol. 245, Nr. 2, p. 315-326.
7. PATIKA, V.; KRUTILO, D.; KĪVALISKA, T. Vpliv aborigenih populacije bulibockovih bakterii soi na simbiotičinu aktivnosti introducovannogo stamu *Bradirrhizobium japonicum* 6346. *Micribiil. J.*, 2004, vol. 66, №3, s. 14-21.
8. SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. Endophytic bacterial communities of field - grown potato plants and their plant-growth promoting and antagonistic abilities. *Can. J. Microbiol.*, 2004, vol. 50, nr. 4, p. 239-249.
9. TATE, R. *Soil microbiology (symbiotic nitrogen fixation)*, New York, N.Y.: John Wiley & Sons, Inc., 1995, p. 307-333.
10. BERESTECKII, O.A. *Metodičeskie rekomendacii po ispol'izovaniū acetilenovogo metoda pri selekcii bobovih kul'itur na povyšenie simbiotičeskoj azotfixacii*. Leningrad: Nauka, 1982, 11s.
11. BERESTECKII, O.A. *Metodičeskie rekomendacii po polučeniū novyh štammov KB i ocenki ih effektivnosti*. Leningrad: Nauka, 20 s.