

## A borsó és bükköny *Rhizobium*-törzseinek nitrogénkötő képessége és virulenciája a gazdanövény különböző növekedési fázisaiban

LÁSZLÓ GYULA

*Mezőgazdasági Kutató Intézet, Bukarest*

Mint ismeretes, a hüvelyesekkel szimbiózisban élő *Rhizobium*-törzsek a vegetáció folyamán a gazdanövény hatására mind virulenciájukat, mind N-kötő képességüket tekintve, jelentős változásnak vannak kitéve. E változások elsősorban a növény élet-tani sajátosságaitól függenek. Ezt bizonyítja az a tény is, hogy a gazdanövény bizonyos fejlődési körülményei között a baktériumok aktivitása növekszik, más viszonyok között pedig csökken. Azon törzsek tiszta tenyészetei, amelyeket különböző agrotechnikai körülmények között levő talajból izoláltam, aktivitás szempontjából igen eltérőek lehetnek egymástól. Az agrotechnikai tényezőkhöz kívül, nagymérvű befolyással lehetnek a baktériumok aktivitására a növények növekedési fázisai is.

Hasonló adatokat közölnek Stewens [7], Lewis [5], Lopatina [6], Korszakova és Konokotina [3], Fred, Wilson és Wyss [2], Fedorov és Hlavackova [1] stb.

Lazareva [4] a vöröshere és a csillagfürt gumóbaktériumait a növény különböző növekedési fázisaiban izolálta és kimutatta, hogy azok nitrogénkötő képessége nagyon változó. Hasonló munkát végeztek Hlavackova és Fedorov a lucernával. Utóbbiaknak sikerült bebizonyítani, hogy legnagyobb aktivitással azok a baktériumok rendelkeznek, amelyeket a kétéves lucerna gumóiból a virágzás kezdetén izoláltak.

Valamivel gyengébbnek bizonyultak azok a törzsek, amelyeket a hároméves lucerna virágzás előtti és az egyéves lucerna magképződési fázisában izoláltak. Érdekes megjegyezni, hogy a virulencia és az aktivitás között meglehetősen eltérést észleltek. Legvirulensebbnek bizonyultak azok a törzsek, amelyeket a hároméves lucerna virágzás előtti fázisában tenyésztettek ki.

E pár adat világosan mutatja, hogy milyen jelentősen befolyásolhatja a gazdanövény különböző fiziológiai állapota a baktériumok aktivitását.

### Kísérleti rész

Jelen dolgozatban azokat a kísérleti eredményeket közlöm, melyek elősegítik a probléma részletesebb megértését.

A kísérleteket növényházban 8—8 kg kvarchomokot tartalmazó üvegedényekben állítottam be. A levegőzés megjavítása céljából minden edénybe 400 g tisztára mosott horzsakövet adtam. Hellriegel I. sz. tápoldatát használtam fel bór (1,2 mg) és molibdén (0,96 mg) hozzáadásával. Nitrogénforrásként  $\text{Ca/NO}_3/2$ -ot használtam három különböző mennyiségben: I. teljes norma, II. 0,5 norma, és III. 0,1 norma Hellriegel tápoldatának megfelelően. A sterilizált mag (sterilizés 2 percig tömény kénsavval) oltására a borsónál a 248. sz. törzset, a bükkönynél pedig a 134. sz. törzset használtam fel. Később, a



növény különböző növekedési fázisaiban (virágzás előtt, virágzás, magképződés, tejesérés, teljesérés idején) a gyökereken képződött gumókból tiszta tenyészeteket állítottam elő, amelyeket identifikáltam. A tiszta tenyészeteket a következő évben újból oltásra használtam fel. Összesen 30 izolátummal végeztem vizsgálatot, a fent felsorolt növekedési fázisoknak és a tápoldatban felhasznált nitrogén mennyiségének megfelelően.

A kísérleteket ugyanolyan viszonyok között állítottam be, mint az előző évben azzal a különbséggel, hogy a nitrogén forrást most már nem változtattam. Mindegyik sorozatban a Hellriegel-féle tápoldat N-tartalmának 0,1-ét adagoltam ugyancsak  $\text{Ca}/\text{NO}_3/2$  alakjában. Pontosabb adatok elérése céljából a kiértékelést két időszakban végeztem; virágzaskor és a tejesérés fázisában. Mindkét esetben meghatároztam a növény össz-nitrogén mennyiségét, a gumók nitrogén-tartalmát pedig külön is. Mindkét fázisban 2—2 edényt vizsgáltam meg, a felhasznált törzseknek megfelelően. Kontrollként a két eredeti törzs szolgált (248. és 134. sz.). A növények számát kikelés után minden edényben a bükkönynél ötre, a borsónál négyre ritkítotam.

A gumók minden sorozatban korán képződtek. Ennek ellenére a növekedés első részében a növények nitrogénhiányban szenvedtek. Virágzás idejére 60—70 cm magasságot értek el, és nitrogén hiánynak — nyilván a baktériumok aktív nitrogénkötő képessége következtében — már semmi jele sem volt.

Annak ellenére, hogy a virágzás minden sorozatnál majdnem egy időben kezdődött, azok a növények amelyeknek oltására a teljes nitrogén-tartalmú, tápoldaton növekedett növények gumóiból izolált baktériumokat használtam fel, fejlődésben kezdtek elmaradni a másik két sorozattól. Megállapítható tehát, hogy a Hellriegel 0,5 és 0,1 N-normájú tápoldatán fejlődött növények gumóiból izolált baktériumok N-kötő aktivitása jóval nagyobb, mint a teljes normájú tápoldaton fejlődött növényekből izolált Rhizobiumoké.

A gazdag nitrogén-tartalmú (teljes norma) tápoldat felhasználása esetén izolált baktériumok közül a borsónál legaktívabbnak bizonyult a magképződés idején kitenyészített izolátum. Az ezzel oltott növények szárazanyag súlya 24,4%-kal nagyobb volt, mint az oltóanyagként általánosan használt 248. számú törzsé. A gumók rendkívül nagy száma erőteljes virulenciát árult el. E sárga színű gumók méretei azonban kicsinyek voltak. A gumókban levő baktériumok alakra nézve nagyobb részét pálcika formát mutattak, de megtalálhatók voltak a bakteroid formák is.

A 0,5 N-normájú tápoldaton növekedett borsó gumóiból izolált baktériumok közül ugyancsak a magképződés idején izolált tenyészet bizonyult a legaktívabbnak. Az ezzel oltott növények súlya 37,3%-kal volt nagyobb a kontrol növény súlyánál.

Legaktívabbnak mutatkoztak a 0,1 N-normájú tápoldat felhasználásával kitenyészített izolátumok. Az abban a sorozatban vizsgált baktériumok mindegyike — függetlenül az izolálás időszakától — jelentősen, mintegy 60%-kal felülmúlta a kontrollként használt 248. sz. törzs N-kötő aktivitását. Ebben az esetben a gumók is jóval nagyobb méretűek, pirosas, vagy rózsaszínűek voltak. A gumókban élő baktériumok nagyobb részét bakteroid alakot mutattak, protoplazmájuk homogén volt, fukszinnal igen jól festődtek.

Közeledve a tejeséréshez, vagyis másodszori analízisi dejéhez, az egyes törzsek közötti különbségek még jobban elhatárolódtak, mind szárazanyag, mind a növény össz-nitrogén mennyiségét illetően. Az erre vonatkozó adatokat az 1. táblázatban közlöm.

A táblázat adataiból világosan látszik, hogy a különböző mennyiségű nitrogént tartalmazó tápoldaton fejlődött növények gumóiból a gazdanövény különböző növekedési fázisában izolált baktériumoknak nitrogénkötő képessége távolról sem azonos. A teljes N-normájú tápoldaton növekedett növények gumóiból a legaktívabb tenyészete-



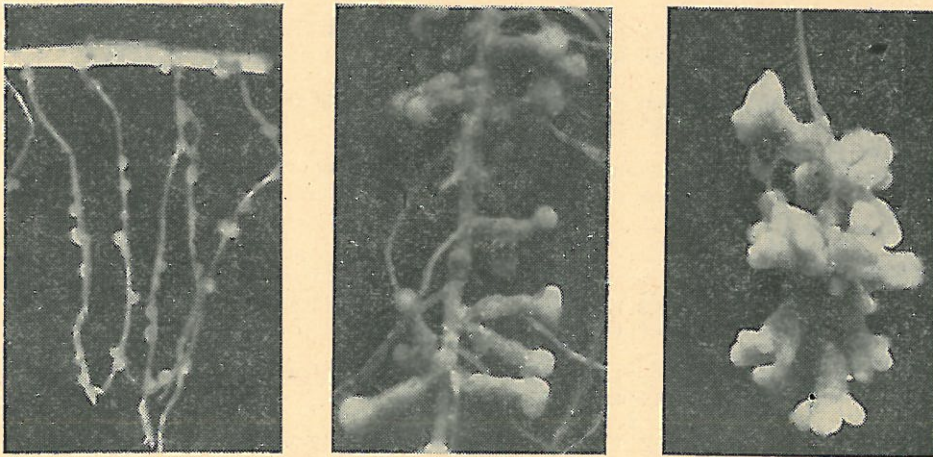
teket a magképződés szakaszában izoláltam. Ez a tényészet az eredeti kontrol törzssel szemben, amely 246,5 mg nitrogént kötött meg, 434,5 mg légköri nitrogént fixált. Valamivel gyengébbnek bizonyult a teljes érskor izolált tényészet (396,9 mg  $N_2$ -t kötött meg). Érdekes megjegyezni, hogy a gazdag nitrogén-tartalmú tápoldatról virágzáskor és virágzás előtt izolált tényészetek aktivitása nem nagyobb, mint a kontrolé.

Még aktívabbnak bizonyultak a 0,5 és 0,1 N normájú tápoldat felhasználása mellett izolált baktériumok. Így pl. a magképződés idején kitenyésztett izolátumok nitrogénkötő képessége mintegy kétszer akkora volt, mint a kontrolé (463,3, ill. 495,57 mg).

A fenti adatok tehát azt igazolják, hogy a tápoldat nitrogéntartalma, valamint a növény különböző növekedési fázisai jelentősen befolyásolják a vizsgált növények gumóiból izolált baktériumok nitrogénkötő képességét. Az a különbség, mely az izolálás pillanatában, a növény fiziológiai állapotától függően, az egyes gumópopulációk között fennáll, további oltások során a terméseredményekben is megmutatkozik, tehát legalább bizonyos ideig állandósul. *Izoláláskor mindig szem előtt kell tartani a gazdanövény egyes növekedési fázisait és a talaj nitrogén-tartalmát.*

Hasonló eredményeket kaptam a bükköny esetében is. Ugyanazok a törvényszerűségek ismétlődnek meg, mint a borsónál, azzal a különbséggel, hogy a 0,1 N-normájú tápoldatról izolált baktériumok aktivitása és virulenciája jóval kisebb, mint a másik két sorozatbeli. A bükkönynél a legaktívabbnak bizonyult — mint ahogy az az 1. táblázat adataiból is látszik — a 0,5 N-normát tartalmazó tápoldatról kitenyésztett törzsek.

Az 1. táblázat adataiból megállapíthatjuk, hogy a gumóbaktériumok aktivitása különböző hüvelyeseknél a gazdanövény különböző fázisaiban, a tápoldat nitrogéntartalmától függően más és más lehet. Ezt a különbséget valószínűleg az egyes hüvelyesek jellege határozza meg, amit izolálás esetén mindig szem előtt kell tartani.



a

b

c

1. ábra

A különböző tápoldatról izolált törzsekkel oltott borsó gyökérgumói a) 1 norma nitrogén, b) 0,5 norma nitrogén c) 0,1 norma nitrogént tartalmazó tápoldat.

A növények gyökerein fejlődött gumók tüzetesebb vizsgálata során sikerült kimutatni, hogy azok aszerint, hogy oltóanyagként milyen izolátumot használtunk, formára és színre nézve igen eltérőek voltak. A kisebb nitrogénkötő képességgel rendel-



## I. táblázat

A növény különböző növekedési fázisaiban kitenyésztett Rhizobium izolátumok virulenciája és nitrogénkötő képessége

A növény növekedési fázisai, amelyekben a baktériumok izolálása történt	Gumók száma	Gumók térfogata ml	Száranyag				A növényben felhalmozódott N <sub>2</sub>				Levegőből megkötött N <sub>2</sub>	
			Földfeletti rész	Mag	Gyökér	Gumó	Földfeletti rész	Mag	Gyökér	Gumó	Összesen	1 mg gumóra átszámítva
<i>Borsó</i>												
<i>I norma nitrogén</i>												
Virágzás előtt ....	640 590	4,0 5,0	7,80 9,00	6,10 5,30	1,00 1,50	0,128 0,239	113,00	151,76	23,27	9,85	230,00	1,22
Virágzás .....	1496 1536	4,5 5,4	9,50 9,80	6,70 6,95	1,40 1,35	0,198 0,212	113,80	182,63	24,21	15,58	311,04	1,07
Magképződés .....	960 1060	6,0 6,0	13,50 13,00	7,50 10,50	1,20 1,60	0,236 0,262	218,97	234,48	29,03	18,16	434,44	1,74
Tejes érés .....	1280 1056	5,0 5,0	10,80 10,20	5,60 5,40	1,30 1,40	0,165 0,180	167,24	159,80	27,11	12,35	299,30	1,74
Teljes érés .....	1094 966	5,5 6,3	12,95 12,50	7,90 7,30	1,50 1,30	0,142 0,194	198,07	227,16	27,84	11,10	396,97	2,36
<i>0,5 norma nitrogén</i>												
Virágzás előtt ....	838 870	7,0 6,0	12,70 13,30	5,20 6,80	1,50 1,55	0,259 0,202	192,37	176,29	29,35	15,84	346,65	1,51
Magképződés .....	342 278	7,0 7,5	13,10 13,50	10,20 9,00	1,45 1,10	0,334 0,258	206,29	281,91	24,09	18,21	463,30	1,59
Teljesérés .....	283 124	6,0 6,4	10,70 10,50	4,95 5,30	1,30 1,32	0,175 0,113	132,84	159,07	25,95	7,76	285,42	1,80
<i>0,1 norma nitrogén</i>												
Virágzás előtt ....	947 989	8,3 8,0	12,80 11,70	6,70 7,50	1,70 1,55	0,254 0,225	157,73	213,30	26,83	16,24	344,90	1,35
Virágzás .....	696 785	8,0 8,9	12,60 12,40	7,80 7,40	1,40 1,75	0,258 0,267	172,61	227,42	24,86	16,81	374,50	1,46
Magképződés .....	557 393	10,7 7,8	13,90 14,60	10,70 9,80	1,50 1,30	0,273 0,263	212,52	305,48	26,08	18,69	495,57	1,84
Tejesérés .....	248 380	6,0 6,0	11,60 10,95	6,80 8,70	1,60 1,50	0,124 0,110	157,46	223,48	26,63	8,39	348,72	2,74
Teljes érés .....	198 134	3,7 4,5	11,90 10,50	6,00 4,70	1,40 1,60	0,115 0,135	123,33	143,89	25,18	8,70	223,90	1,87
Kontrol 248 .....	850 937	5,3 4,5	9,13 8,70	5,47 6,18	1,20 1,40	0,102 0,114	128,74	156,56	23,53	5,26	246,49	2,34



1. táblázat folytatása

A növény növekedési fázisai, amelyekben a baktériumok izolálása történt	Gumók száma	Gumók térfogata ml	Száranyag				A növényben felhalmozódott N <sub>2</sub>				Levegőből megkötött N <sub>2</sub>	
			Földfeletti rész	Mag	Gyökér	Gumó	Földfeletti rész	Mag	Gyökér	Gumó	Összesen	1 mg gumómóra átszámítva
			g				mg					
<i>Bükköny</i>												
<i>1 norma nitrogén</i>												
Virágzás előtt ....	1093 990	4,0 4,0	4,00 4,10	2,00 1,80	0,95 0,97	0,134 0,118	83,63	65,20	17,62	6,95	106,20	0,61
Virágzás .....	1168 1273	3,9 5,0	4,80 4,40	1,90 2,30	0,90 1,00	0,102 0,220	92,68	72,33	17,31	6,10	121,22	1,06
Magképződés .....	1403 1651	4,6 5,1	6,70 6,00	3,10 3,50	0,90 1,40	0,145 0,174	131,79	103,81	21,10	8,70	197,20	1,20
Tejesérés .....	1336 1295	4,0 4,8	5,20 5,00	2,35 2,50	0,85 0,93	0,117 0,123	106,70	81,15	19,31	6,70	146,56	0,88
Teljes érés .....	1376 1517	5,4 6,0	6,75 6,10	3,40 3,60	1,05 1,35	0,160 0,157	137,61	105,56	22,24	8,35	206,56	2,04
<i>0,5 norma nitrogén</i>												
Virágzás előtt ....	1025 1082	5,0 4,8	6,30 5,90	3,15 2,40	0,90 1,30	0,162 0,184	124,21	94,38	22,64	9,85	183,88	1,06
Magképződés .....	938 875	6,3 6,0	8,00 8,22	3,60 4,04	1,10 1,20	0,183 0,147	167,99	123,14	15,62	9,50	249,05	1,51
Teljes érés .....	1525 1403	4,0 4,9	6,10 6,50	2,50 2,70	1,00 1,35	0,102 0,110	155,67	79,70	28,39	5,55	202,11	1,92
<i>0,1 norma nitrogén</i>												
Virágzás előtt ....	917 749	3,5 3,6	6,30 6,50	1,50 1,20	1,00 1,00	0,102 0,101	128,24	49,44	24,28	4,80	139,56	1,38
Virágzás .....	836 610	3,8 3,0	5,20 3,60	1,10 0,40	0,60 0,90	0,081 0,068	100,42	22,76	15,51	2,05	73,54	0,93
Magképződés .....	711 889	2,7 3,0	5,10 4,90	1,80 0,90	0,85 1,00	0,079 0,084	106,49	41,14	17,45	2,20	100,38	1,23
Tejesérés .....	343 234	4,0 3,0	4,40 3,90	1,40 1,00	0,80 1,10	0,100 0,093	88,81	36,81	18,15	4,60	81,17	0,84
Teljes érés .....	360 476	1,5 2,0	4,10 4,00	1,10 0,90	0,80 0,80	0,078 0,080	81,45	23,60	20,82	3,05	61,72	0,78
Kontrol 134 .....	827 1442	3,15 3,5	4,95 5,23	1,60 2,10	0,70 0,95	0,069 0,075	102,81	67,47	15,25	8,10	118,33	1,64



kező törzsek leggyakrabban nagymennyiségű, de kicsiny, sárga színű gumókat képeztek. Az aktív törzsek viszont kisebb virulenciával rendelkeztek, de a képződött gumók nagyok, pirosak, v. rózsaszínűek (1. ábra).

A gumók ily nagymérvű forma- és szerkezetbeli különbsége egyben utal a gumó-baktériumok különböző életfeltételek közti tevékenységére is. Természetes, hogy a különböző formájú és szerkezetű gumókban maguknak a baktériumoknak is változnak mind morfológiai, mind fiziológiai sajátosságai.

A nagyméretű gumókban inkább a bakteroid formák vannak túlsúlyban. Aktív N-kötő képességgel rendelkező izolátumokkal való oltás esetén — annak ellenére, hogy kevés számú gumó képződött — az egy növény gyökerén fejlődött gumók térfogata nagyobb, mint a gyenge aktivitású izolátumokból származó gumóké. A gumók számát általában nem lehet irányadónak venni az aktivitást illetően.

A kísérleti eredmények azt bizonyítják, hogy sokkal megbízhatóbb útmutatást ad a gumóbaktériumok N-kötő aktivitására vonatkozólag a gumók térfogata, — amellyel együtt jár természetesen a gumók nagyobb bakteroid szövetrétegződése is — mint a gumók száma.

Az előbbieket szerint, amennyiben az izolálás pillanatában a gumókban túlsúlyban vannak a bakteroid formák, — melyeknek N-kötő aktivitása igen jelentős — az izolátumok további oltásra való felhasználás során ugyancsak aktívak maradnak. Amennyiben pedig az izolálás pillanatában a gumókban levő baktériumok még nem kapcsolódtak be a légköri nitrogén megkötésébe, vagyis amikor még kicsiny pálcika, vagy kokkusz alakúak és nincsen kifejlődve a légköri N-megkötésében aktívan résztvevő enzimrendszerük, a további oltások folyamán ugyancsak nagyon kismértékben járulnak hozzá egy valódi szimbiotikus viszony kifejlődéséhez. Hasonló eredményeket kaptunk azonos agrotechnikai körülmények között termesztett növény gumóiból, a gazdanövény különböző növekedési fázisaiban izolált baktériumoknál, valamint különböző agrotechnikai viszonyok között termesztett növények gumóiból, de egy és ugyanazon növekedési fázisban izolált baktériumok felhasználásánál is. Így pl. a teljes N-normájú tápoldaton termesztett növények gyökérgumóiból teljes érés idején izolált tenyészetek — amikor a gumókban már túlsúlyban voltak a bakteroid formák — aktívabbnak bizonyultak, mint a 0,5 N-normájú tápoldaton termesztett növények gumóiból ugyancsak a teljes érés idején izolált tenyészetek. Ez utóbbiaknál azonban az izolálás pillanatában már a pálcika alakú baktériumok domináltak. *Feltételezhető tehát, hogy valamely törzs későbbi aktivitását azok a fiziológiai és az ezt kísérő morfológiai tulajdonságok szabják meg, amelyekkel az illető törzs az izolálás pillanatában rendelkezik.*

A fent közöltekből látható, hogy egyszerű mikroszkóppal is érzékelhetők a gumó-baktériumok sejtjeinek olyan forma és strukturális különbségei, amelyek az aktív N-kötő képességgel rendelkező törzsek kiválasztásához igen nagy segítséget adnak.

Külön kérdés, hogy egy gumópopuláció, mely az izolálás pillanatában bizonyos fokú aktivitással bírt, mennyi ideig tudja ezt a képességet laboratóriumi tenyészetben megőrizni.

E probléma megvilágítása céljából a két évig balfőzetben tenyésztett izolátumokkal oltottuk a borsót. A kísérleteket tisztára mosott kvarchomokkal tenyészedenyekben végeztük. Hellriegel I. sz. tápoldatát használtuk fel azzal a változtatással, hogy az előírt N-mennyiségnek csupán a 0,1 részét adagoltuk.

A kísérleti eredmények (2. táblázat) azt mutatják, hogy az egyes izolátumok N-kötő aktivitása, hosszabb laboratóriumi tenyésztés után jelentősen csökkent. Különösen érvényes a megállapítás azoknál az izolátumoknál, amelyeknek kiinduló aktivitása is gyenge volt.



Így pl. a teljes N-normájú tápoldatról izolált tenyészetek virulenciája és aktivitása annyira legyengült, hogy az ezekkel oltott növények a 0,1 N-normájú tápoldaton már nem tudtak normálisan fejlődni.

A 2. táblázat adatai igazolják, hogy a 0,1 norma nitrogén tápoldatról nyert izolátumok sokkal jobban megőrzik a nitrogén-kötő aktivitásukat — jóllehet itt is észerevehető változás következik be — mint a magasabb N tartalmú tápoldatról kitenyésztett baktériumok. E baktériumok a kontrol törzshöz viszonyítva 50%-os termés-többletet eredményeztek. Érdemes megjegyezni, hogy virulenciájuk az előbbi évekhez képest még növekedett is. *Következésképpen megállapítható, hogy a gumóbaktériumok laboratóriumi tenyészeteiben hamarabb elvesztik aktivitásukat, mint virulenciájukat.*

Úgy látszik, hogy a baktériumok eme második tulajdonsága sokkal ellenállóbb, mint az első, ami amellet szól, hogy a hüvelyesek és a Rhizobiumok közt a kezdeti viszony más lehetett, mint jelenlegi kapcsolatuk. Valószínű, hogy a kölcsönös viszony első formájában e baktériumok parazitikus életmódot folytattak és hosszú együttélés után alakult ki a baktériumok nitrogénkötő sajátossága.

A növény különböző növekedési fázisaiból izolált baktérium-tenyészetek azonban nemcsak morfológiailag, hanem élettanilag is különböznek egymástól. Ezt bizonyítják a következőkben a közölt adatok is.

Babfőzetet, amelyhez 1% glukózt adtam, beoltottam a vizsgálandó tenyészettel. 30 napos inkubáció után azonban az elhasznált cukor mennyiségéből semmiféle különbséget nem sikerült az egyes izolátumok között megállapítani.

Mint ismeretes, a nitrogén biológiai megkötése oxidációs és redukciós folyamat. A továbbiakban tehát a baktériumok oxidációs és redukciós tevékenységét vizsgáltuk. E célból magas próbacsövekben, szintetikus táptalajon, különböző hidrogén donatorok és biológiai indikátorok (metilinkék, indigó-karmin, metilzöld) jelenlétében tenyésztettem a vizsgálandó izolátumokat. Sajnos, az ezirányú kísérletek sem jártak kellő eredménnyel, mert az indikátorok redukciója aktív és kevésbé aktív izolátumoknál semmiféle törvényszerűséget nem mutatott.

Egy másik kísérletsorozatban a sejtek számát vizsgáltam, különböző energetikai anyagok felhasználásával. A nitrogént különböző aminosavak formájában adagoltuk a folyékony szintetikus táptalajhoz. A megfigyelésekből kitűnt, hogy az aktív izolátumok, ugyanolyan baktériumszám mellett, sokkal gazdaságosabban használták fel az illető szénforrást. Ennek következtében az aktív N-kötő képességgel rendelkező izolátumok egy és ugyanazon idő alatt, 1 g cukorra átszámítva, sokkal nagyobb sejtszámot adtak, mint a kevésbé aktívak. Megjegyzem, hogy a sejtek nagysága a nagy

2. táblázat

A borsó gumóbaktériumainak virulenciája és N-kötő aktivitása két éves laboratóriumi tenyésztés után

A növény növekedési fázisai, amelyekben a baktériumok izolálása történt	Gumók száma	Földfeletti rész szárazanyag súlyának átlaga	A gyökér súlya	A növény összsúlya	Termés %-ban a kontrolhoz viszonyítva

1. norma nitrogén

Virágzás előtt..	0,0	1,75	—	1,75	44
Virágzás .....	540	2,45	0,80	3,25	82

0,1 norma nitrogén

Virágzás .....	890 947	4,67	1,03	5,70	144
Magképződés ..	806 1034	4,86	1,10	5,96	150
Tejesérés .....	840 720	3,90	0,95	4,85	125
Kontrol 248 ..	790 —	3,00	0,95	3,95	100



sejtszám mellett sem csökkent. Így pl. míg az aktív izolátumok sejtnagysága 2—3,5  $\mu$  között változott, addig a kevésbé aktív törzsek sejtnagysága 2—3  $\mu$  volt. Nyilvánvaló tehát, hogy az aktív tenyészetek sokkal gazdagabbak használják fel a növénytől kapott szénhidrátokat, vagyis 1 g cukor hidrolízese folytán felszabadult energiából sokkal több sejtanyagot képesek szintetizálni. Következésképpen feltételezhető, hogy ilyenformán az aktív izolátumok nagyobb mennyiségű molekuláris nitrogént vonnak be a biológiai körfolyamatba, elősegítve ezzel a növény gyorsabb és erőteljesebb növekedését.

A továbbiakban kísérleteket állítottam be annak megállapítására, hogy milyen mértékű az aktív és nem aktív izolátumoknál az oxidációs folyamatokban résztvevő enzimek működése. E célból, folyékony táptalajon, amelyet előzőleg az egyes izolátumokkal már beoltottam, CO<sub>2</sub> mentes levegőt fúvattam át, egy másik kísérletben pedig állandó rázással segítettém elő a táptalaj gazdagabb oxigénellátását.

A sejtszaporulatban mindkét esetben jelentős gyorsulás volt tapasztalható, de különösen a vegetációs kísérletekben aktívnak bizonyult izolátumok használták fel igen intenzíven a rendelkezésre álló szénforrást. Ennek alapján feltételezhető, hogy az aktív izolátumok sokkal gazdagabb légzési fermentumokkal rendelkeznek, mint a kevésbé aktívak. Ez a kísérleti módszer a Rhizobium törzsek N-kötő aktivitásának vizsgálatánál igen könnyen megvalósítható. Ennek megerősítésére még egy kísérleti sorozatot állítottam be, amelynek során Warburg manometrikus módszerével pontosan mértem a különböző izolátumok oxigénfogyasztását.

Kétnapos babfőzet-agartenyészetekből glukózt tartalmazó babfőzettel egyenlő sejtszámú szuszpenziót készítettem. A szuszpenziót 5 cm<sup>3</sup>-enként szétadagoltam Warburg edényekbe. A kísérlet 30 C°-on 5 órán át folyt. A különböző izolátumok által ez idő alatt elhasznált molekuláris oxigén mennyiségét a 3. táblázat adatai tüntetik fel.

3. táblázat

Különböző baktériumtörzsek légzési intenzitása Warburg manometrikus módszere alapján

A növény növekedési fázisai, amelyekben a baktériumok izolálása történt	Elhasznált O <sub>2</sub> mennyiség mm <sup>3</sup> -ben	
	Középtérték	%-ban a kontrolhoz viszonyítva
<i>1. norma nitrogén</i>		
Virágzás . . . . .	55,22	213,5
Magképződés . .	56,89	219,9
<i>0,1 norma nitrogén</i>		
Virágzás . . . . .	77,75	300,6
Magképződés . .	76,61	296,2
Tejesérés . . . . .	76,11	294,3
Kontrol . . . 248	25,86	100,0

A 3. táblázat adataiból könnyen megállapítható, hogy a légzés intenzitása a különböző izolátumoknál igen változékony volt. A növényvel a szimbiózisban aktívnak bizonyult izolátumok a légzés folyamán sokkal interzívebben használják fel a molekuláris oxigén is.

Ez a megállapítás Fedorov ama feltevését bizonyítja, hogy a nitrogén megkötése szoros kapcsolatban van a légzési folyamatokkal és tulajdonképpen a függvényének mondható.

Az ismertett kísérleteink természetesen még sok hiányossággal bírnak, de nem kétséges, hogy egy igen egyszerű és hasznos munkamódszerhez jutnánk; ha hasonló eredményeket más növények gumóbaktériumainál is ki lehetne mutatni.

Ez úton végre elkerülhető lenne az eddig használt hosszadalmas módszer, amely a baktérium tenyészeteknek az illető növényvel való kipróbálásán alapul, és amely egy teljes évet véve igénybe, gyakorlati szempontból igen hátrányos.



### Összefoglalás

1. A talaj nitrogén ellátottsága, valamint a növény különböző növekedési fázisai jelentősen befolyásolják a vizsgált növények gumóiból izolált baktériumok nitrogénkötő képességét. Az a különbség, amely az izolálás pillanatában — a növény fiziológiai állapotától függően — az egyes izolátumok között e tekintetben fennáll, mesterséges tenyészetben bizonyos ideig állandósul és az izolátumok további oltásra való felhasználása esetén a természetes eredményben is megmutatkozik. Ezért izoláláskor mindig szem előtt kell tartani a gazdanövény növekedési fázisait és a talaj nitrogéntartalmát.

2. Sokkal megbízhatóbb eredményeket ad a Rhizobium-törzsek nitrogén aktiválására vonatkozólag a gumók térfogata, valamint az ezekben élő baktériumok fejlődési ciklusa, mint a gumók száma.

3. Feltételezhető, hogy valamely törzs nitrogénkötő aktivitását azok a fiziológiai és az ezeket kísérő morfológiai tulajdonságok szabják meg, amelyekkel az illető törzs az izolálás pillanatában rendelkezik.

Érkezett: 1957. július 30.

### Irodalom

- [1] Fedorov, M. V. & Hlavacskova, E.: Izvesztija, T. Sz. H. A. vüp. 1. 1956.
- [2] Fred, E. B., Wilson, P. W. & W'ys, O.: *Proceed. of the Nation. Acad. Scien.* V. 24. No 1, p. 42, 1938.
- [3] Korszakova, M. & Konokotina, A.: *Trudü Vseszajuznogo insztituta Sz-H. mikrobiologii VASZHNIL*, 8. 2, 1936.
- [4] Lazareva, N.: *Trudü Vseszajuznogo insztituta Sz-H. mikrobiologii VASZHNIL*, 12. 1951.
- [5] Lewis, I. M.: *Journ. Bacteriol.* V. 35, p. 373—378, 1938.
- [6] Lopatina, G.: *Trudü Vseszajuznogo insztituta Sz-H. mikrobiologii VASZHNIL*, 12. 1951.
- [7] Stewens, J. W.: *Soil Sci.* V. 20, p. 45. 1925.

### АЗОТФИКСИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ И ВИРУЛЕНЦИЯ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ГОРОХА И ВИКИ В РАЗНЫХ ФАЗАХ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

Дь. Ласло

Сельскохозяйственный Исследовательский Институт Бухарест (Румыния)

#### Резюме

Клубеньковые бактерии, живущие в симбиозе с бобовыми растениями, во время вегетации при действии растения-хозяина изменяются как в их вирулентии так и азотфиксирующей способности.

В настоящей работе опубликованы экспериментальные данные о том, как наследуют клубеньковые бактерии те особенности, которые приобрели в совместной жизни с растением, при действии изменения физиологических свойств растения-хозяина.

Опыты были поставлены в вегетационных сосудах, наполненных 8 кг кварцевого песка и для аэрации, 400 г пемзы. Для опытов использовался питательный раствор Гельригеля с микроэлементами бор и молибден. В качестве источника азота служил  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  в количествах: полная норма, 0,5 нормы и 0,1 по Гельригелю. Для заражения стерильного зерна (стерилизация проводилась концентрированной серной кислотой в течение двух минут) использовались штаммы: у гороха — № 148, у вики — № 134.

Выделение бактерий из клубеньков проводилось: перед цветением, во время цветения, образования зерна, молочной и полной спелости. Изолированными бактериями (30 штамм) в следующем году, в описанных опытных условиях, сделали заражение зерна.



Наблюдение действия выделенных штаммов на развитие растений было отмечено в фазе цветения и молочной спелости. Для этой цели определяли количество общего азота растений. В качестве контроля служили две исходные культуры (№ 248 и № 134). У гороха оказались самыми активными штаммы, выделенные при использовании 0,1 нормы азота. В этом варианте изолированные культуры, независимо от времени выделенные, на 60% повысили урожай растения по сравнению с штаммом № 248.

Клубеньки были крупные, красные или розоватые, а бактерии, живущие в клубеньках в большинстве бактеронды.

Примерно такие же результаты получились у вики, разница заключалась только в том, что у этого растения самыми активными оказались культуры, выделенные из сосудов с нормой азота 0,5.

Выше указанные данные говорят о том, что в зависимости от содержания азота питательного раствора, а также от фазы развития растения, способность фиксации атмосферного азота бактерий, изолированных из клубеньков, изменяется в большом размере.

Та разница, которая наблюдается между штаммами во время выделения отдельных культур за счет физиологического состояния растения — передается поколениям.

Установлено, что штаммы, обладающие меньшей азотфиксирующей способностью, чаще образуют желтые клубеньки, но они малы по размеру. У активных штаммов, наоборот, вируленция не большая, но клубеньки крупные, красные или розоватые, в них наблюдаются клетки по форме бактерондов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что объем клубеньков дает лучшее указание на азотфиксирующую способность клубеньковых бактерий, чем число клубеньков. Если во время выделения бактерий в клубеньках находятся в большом количестве бактероидные формы, азотфиксирующая способность которых выше, чем кокковидных или палочковидных форм, — то в случае дальнейшего заражения зерна выделенными культурами, эти бактерии будут более активными.

Далее заражали горох штаммами, культивированными в течение двух лет в бобовом отваре. Результаты утверждают, что активность отдельных штаммов после длительной лабораторной культивации уменьшается.

Это изменение, но в меньшей степени, наблюдается у бактерий, выделенных с питательного раствора с 0,1 нормой азота. Вируленция этих бактерий, по сравнению с предыдущими годами даже поднялась. Клубеньковые бактерии при лабораторной культивации раньше теряют свою азотфиксирующую активность, чем вируленцию.

Бактерии, выделенные в разные фазы развития растений, отличаются друг от друга как по морфологии, так и по физиологии.

Изучаемые штаммы, обладающие большей азотфиксирующей способностью, в то же время дают большее число клеток, перечисленных на 1 г сахара, чем штаммы, которые менее активны, причем, размер клеток большинства бактерий не уменьшается.

Ясно, что активные штаммы клубеньковых бактерий на много экономнее используют углеводы, полученные от растения, проще говоря, из энергии, освобожденной при гидролизации 1 г сахара, активные бактерии способны синтезировать большее количество клеточных веществ. Из этого можно предположить, что активные штаммы гораздо больше  $N_2$  включают в биологический круговорот азота.

Использование  $O_2$ , выделенных культур, измерили манометрическим методом Варбурга. Более активные штаммы гораздо интенсивнее используют и  $O_2$ .

Этот факт подчеркивает предположение Федорова, что азотфиксация находится в тесной связи с процессами дыхания.

## Le pouvoir de fixer l'azote et la virulence des souches de Rhizobium du pois et de la vesce dans les différentes phases de la croissance de la plante hôte

GY. LÁSZLÓ

Institut de Recherches Agronomiques, Bucarest (Roumanie)

### Résumé

Les souches de Rhizobium vivant en symbiose avec les légumineuses présentent, sous l'influence de la plante hôte, des variations notables concernant leur virulence et leur pouvoir de fixer l'azote au cours de la végétation.



Dans ce mémoire nous présentons les résultats de nos expériences faites pour élucider comment les souches de *Rhizobium* transmettent par héritage les propriétés qu'elles ont acquises au cours de la symbiose par l'effet des changements survenus dans la constitution physiologique de la plante hôte.

Les expériences ont été faites dans des vases en verre contenant 8 kg de sable de quartz et, pour assurer une aération convenable, 400 g de pierre ponce, placés en serre. Nous nous sommes servis de la solution nutritive No 1 de Hellriegel avec adjonction de bore et de molybdène. Les doses du nitrate de calcium employé comme source d'azote ont été: 1. norme entière, 2. 0,5 norme et 3. 0,1 norme. Pour inoculer la graine stérilisée (la stérilisation a été faite avec de l'acide sulfurique concentré pendant 2 minutes) nous nous sommes servis de la souche No 248 pour le pois et de la souche 134 pour la vesce. L'isolation des bactéries à partir des nodules a été effectuée dans les phases de croissance de la plantes suivantes: avant la floraison, à la floraison, à la formation de la graine, à la maturation laiteuse et complète. Avec les souches isolées (30) nous avons fait de nouveau des inoculations dans les mêmes conditions que l'année précédente. L'évaluation de l'effet exercé par les souches sur le développement de la plante a eu lieu dans les phases de la floraison et de la maturation complète. Dans ce but nous avons déterminés la teneur totale en azote de la plante, et séparément aussi la teneur en azote des nodules. Les souches originales (248, 134) ont servi de contrôle.

Dans le cas du pois les cultures des souches obtenues avec l'emploi de la solution nutritive à 0,1 normes ont été les plus actives. Toutes les bactéries examinées dans cette série — indépendamment du temps de l'isolation — ont donné un rendement de 60% plus élevé, environ, que la souche No 248 servant de contrôle. Les nodules sont de grande taille, rouges ou roses et les bactéries qui s'y trouvaient ont été pour la plupart de forme bactéroïde.

Nous avons obtenu le même résultat aussi avec la vesce, avec cette différence que c'étaient les souches obtenues de la solution nutritive contenant 0,5 normes d'azotes, qui ont été les plus actives.

Ces données prouvent que le pouvoir de fixer l'azote des bactéries isolées des légumineuses examinées change fortement en dépendances de la teneur en azote de la solution nutritive et des différentes phases de croissance de la plante. La différence qui existait au moment de l'isolation parmi les différentes souches — en dépendance de l'état physiologique de la plante — est transmise par héritage.

Au cours de l'étude détaillée des nodules développées sur les racines des plantes nous avons établi que les souches possédant un pouvoir moindre de fixation de l'azote forment le plus souvent des petites nodules jaunes en grand nombre. Par contre les souches actives possèdent une virulence plus faible, mais les nodules développées sont grandes, rouges ou roses. Dans les grandes nodules ces sont plutôt les formes bactéroïdes qui dominent. Les résultats obtenus prouvent que le volume des nodules fournit des indications plus sûres, quant à l'activité de fixer l'azote de la bactérie de la nodule, que le nombre des nodules. Si au moment de l'isolation prédominent dans les nodules les formes bactéroïdes — dont l'activité de fixer l'azote est beaucoup plus considérable que celle des bactéries de formes de bâtonnet ou de coccus — les souches isolées conservent leur activité en cas d'inoculation consécutive.

L'on peut donc admettre que l'activité ultérieure d'une certaine souche est déterminée par les conditions physiologiques et les propriétés morphologiques les accompagnant dont dispose cette souche au moment de l'isolation.

Dans des essais ultérieurs nous avons inoculé le pois avec des souches cultivées au laboratoire pendant 2 ans dans du bouillon de fève. D'après les résultats obtenus l'on peut établir que l'activité des souches diminue notablement après une culture prolongée au laboratoire. Ce changement a pu être observé à un degré moindre dans le cas des souches isolées d'une solution nutritive à 0,1 normes d'azote et même la virulence de ces souches s'est faiblement accrue en comparaison avec les années précédentes. Dans les cultures au laboratoire les bactéries des nodules perdent leur activité plus vite que leur virulence.

Les différentes souches de bactéries isolées dans les diverses phases de croissance de la plante diffèrent non seulement morphologiquement, mais aussi au point de vue physiologique. Parmi les bactéries étudiées celles qui possèdent un pouvoir actif de fixer l'azote ont donné, pendant le même temps, un nombre de cellules beaucoup plus élevé, plus pour 1 g de sucre, que celles moins actives, et, en même temps, la grosseur des cellules n'a pas diminué malgré leur nombre plus considérable. Il est évident que les souches actives élaborent beaucoup plus économiquement les hydrates de carbone qui leur sont fournis par la plante, c'est-à-dire



qu'elles sont capables de synthétiser beaucoup plus de matières cellulaires à partir de l'énergie devenue libre par l'hydrolise d'un gramme de sucre. Ainsi l'on peut admettre que les souches actives attirent une plus grande quantité de  $N_2$  dans le cycle biologique.

Nous avons mesuré avec la méthode manométrique de Warburg la consommation d'oxygène des souches examinées. Au cours de la respiration les souches possédant une forte activité de fixer l'azote consomment aussi plus intensivement l'oxygène moléculaire. Ce fait appuie l'hypothèse de Fjodorof selon laquelle la fixation de l'azote est liée étroitement aux processus de la respiration, elle en est pour ainsi dire une fonction.