

CERCETĂRI PRIVIND CAPACITATEA DE COLONIZARE A SOLULUI ȘI PLANTEI DE SOIA DE CĂTRE UNELE MICROORGANISME DE RIZOSFERĂ

*Dr. L. Onofraș, dr. V. Todiraș, dr. S. Prisacari, T. Mohova
Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM*

1. INTRODUCERE

Condițiile climaterice ale Republicii sunt relativ satisfăcătoare pentru cultivarea soii. Începând cu a. 2000 și îndeosebi a.a. 2006-2010 sub influența economiei de piață și a tehnologiilor progresiste din Occident cultivarea soii în Moldova a devenit o îndeletnicire esențială în agricultură, astfel, planificându-se anual însămânțarea cu soia a peste 50 mii ha.

Interesul manifestat față de această cultură se explică pe de o parte prin proprietățile ei nutritive utile atât pentru om cât și pentru animale, pe de altă parte soia este o cultură cu mai mici cerințe față de elementele nutritive, deoarece are capacitatea de a asimila azotul din atmosferă prin intermediul microorganismelor din rizosfera/rizoplana ei.

Pe parcursul a.a. 2006-2008 în cadrul laboratorului Fitomicrobiologie s-au făcut cercetări în scopul evidențierii pe teritoriul Republicii a tulpinilor de bacterii stimulative a creșterii și dezvoltării plantelor. Microorganismele evidențiate au fost studiate și selectate, în final fiind alese pentru experiențe 2 bacterii producătoare a bioregulatorilor de creștere. Eficacitatea fiecărei tulpini depinde de mai mulți factori, inclusiv de însușirea de a coloniza suprafața radiculară a plantei (rizoplana) și solul din rizosferă. Acest aspect a fost pus la baza cercetărilor ce au urmat.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

În calitate de obiect pentru investigații au servit microorganismele izolate din rizosfera și rizoplana plantelor de soia : *Pseudomonas* sp. BȘSg și RRA8.

Pentru efectuarea experiențelor a fost necesar de a obține varianta antibioticorezistentă a tulpinilor menționate. În acest scop acestea au fost tratate cu antibioticul Streptomycina, concentrația inițială a căruia a fost de 5 unități. Tulpinile treptat s-au adaptat la 20, 50, 100, 500 și 1000 unități, ultimele fiind folosite la efectuarea experiențelor planificate.

Capacitatea de colonizare de către microorganismele a sistemului radicular și solului a fost determinată conform metodelor propuse de autorii [1,2,3].

Determinarea activității de stimulare asupra creșterii, dezvoltării și productivității plantelor de soia s-a efectuat în baza metodei aprobate [4]. Pentru montarea experiențelor tulpinile selectate se renovau după perioada de păstrare, apoi se cultivau în condiții de agitare timp de 6 zile în mediul nutritiv lichid: King B, Așbi, la temperatura 26-28⁰ C. În condiții de laborator experiențele s-au făcut în vase cu sol plasate în camere vegetative, unde parametrii de temperatură, umiditate și iluminare erau reglați.

Aprecierea eficacității fiecărui microorganism s-a făcut reieșind din capacitatea de germinare a semințelor, înălțimea plantelor, masa brută și uscată, iar după o lună de vegetație s-a determinat gradul de colonizare al sistemului radicular și al solului.

În condiții de câmp experiențele au fost montate în sol cernoziom, pH 7,0. În calitate de cultură premergătoare au servit plantele legumicole. Fiecare variantă a fost pusă în 4 repetări. Eficacitatea microorganismelor în aceste condiții s-a apreciat în baza cantității de biomasă brută și uscată a plantelor, înălțimii lor, numărului păstăilor și recoltei de boabe. În faza de înflorire și începutul formării păstăilor s-a determinat activitatea azotofixatoare, numărul de nodozități, masa lor brută și uscată. Tot în aceasta fază s-au luat probe de plante și sol pentru determinarea gradului de colonizare a solului și sistemului radicular de către microorganismele aflate în proces de studiere.

Datele obținute au fost prelucrate prin metode matematice (5).

3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

3.1. Experiențe de laborator

Pentru montarea experiențelor tulpinile *Pseudomonas* sp. BȘSg și RRA8 (stimulative a proceselor de germinare, creștere și dezvoltare) au

fost tratate cu antibioticul streptomycină conform metodei menționate mai sus, în rezultat fiind obținute tulpini adaptate față de acest antibiotic.

De menționat, că pentru tulpina RRA8 nu s-a reușit obținerea formei rezistente față de streptomycină, fapt, datorită căruia pentru determinarea capacității de colonizare a acesteia au fost folosite caracterele morfologice ale coloniilor. Fiecare variantă a fost exercitată în 4 repetări.

La finisarea experiențelor, după 30 zile, rădăcinile plantelor erau extrase din sol, spălate cu apă din robinet, în prealabil sterilizată, fiind apoi mărunțite în condiții sterile, după care o cantitate de 1 g rădăcini din fiecare repetare era folosit pentru determinarea numărului de celule al inoculațiilor (BSSg și RRA8), folosind mediile nutritive respective cu adaos de streptomycină.

Rezultatele analizelor sunt expuse în tab.1.

Tabelul 1. Gradul de colonizare a sistemului radicular și solului de către tulpinile *Pseudomonas* sp. BSSg și RRA8 (exp. vegetativă, a.2009).

Varianta	Numărul de celule la 1 g /sol	Numărul de celule la 1 g /rădăcini
<i>Tulpina BSSg</i>		
Martor	30,6x10 ⁶	335x10 ⁶
BSSg 1000 unit.	32,9x10 ⁶	189x10 ⁶
<i>Tulpina RRA8</i>		
Martor	3.3x10 ⁵	2x10 ⁵
RRA8	2.86x10 ⁶	6.23x10 ⁶

Tabelul 2. Influența bacteriilor stimulative asupra creșterii și productivității plantelor de soia a.2009 (calculare la 2 plante).

Varianta	Înălțimea plantelor, cm, M± m	Adaos față de martor, %	Masa brută a plantelor, gr, M± m	Adaos față de martor, %	Masa uscată a plantelor, gr, M± m	Adaos față de martor, %
1	2	3	4	5	6	7
<i>Experiența vegetativă nr.1</i>						
Martor	36,0±3,3	-	3,24±,59	-	0,27±0,04	-
BSSg	38,4±3,2	6,5	3,51±0,52	8,4	0,29±0,04	6,4
RRA8	41,1±2,4	14,1	3,84±0,29	18,7	0,31±0,03	12,8
<i>Experiența vegetativă nr.2</i>						
Martor	54,6±1,8	-	5,06±0,46	-	0,51±0,08	-
BSSg	56,0±2,3	2,6	4,63±0,27	-	0,50±0,03	-
RRA8	56,6±2,4	3,7	5,17±0,48	2,2	0,54±0,05	6,9

Pentru aprecierea gradului de colonizare a fost folosită gradarea propusă de Scher et. al (6), conform căreia pot fi considerate colonizatoare ale solului și plantelor acele tulpini de bacterii care se acumulează în cantități mai mari de 5x10³ celule la 1 g rădăcini. Luând la bază această gradație și reieșind din datele obținute poate fi făcută concluzia, că tulpinile bacteriilor stimulative (BSSg și RRA8) colonizează solul și sistemul radicular al plantelor,

însă, este necesar de menționat că tulpina BSSg adaptată la antibiotic este mai sensibilă față de microorganismele autohtone din sol scăzând numeric considerabil față de tulpina neprelucrată (v. tab. 1).

Concomitent cu procesul de colonizare în experiențele întreprinse au fost evaluate și efectele inoculării asupra mai multor indici ce caracterizează procesele de creștere și dezvoltare a plantelor (v. tab.

2). Datele obținute în experiențele de laborator referitor la influența inoculării asupra creșterii și dezvoltării plantelor (v. tab.2) demonstrează o activitate mai înaltă a tulpinii RRA8 față de martor în timp ce tulpina BSSg s-a dovedit a fi chiar mai puțin activă decât martorul. Sub influența tulpinii RRA8 înălțimea plantelor a devenit cu 3,7- 14,1% mai mare, masa brută cu - 2,2-18,7%, masa uscată - cu 6,9-12,8%. Tulpina BSSg adaptată la streptomycină a demonstrat o activitate negativă asupra acumulării de biomasă iar influența pozitivă asupra procesului de creștere a fost de numai 2,6% față de martor.

Concluzia finală făcută în cazul experiențelor vegetative de laborator cu tulpinile stimuloare (BSSg și RRA8) este că ambele tulpini colonizează (în condiții controlabile) la un nivel înalt atât solul cât și sistemul radicular, influențând pozitiv procesele de creștere și dezvoltare a plantelor. Pentru determinarea gradului de colonizare a sistemului radicular și a solului de către bacteriile respective s-au făcut experiențe și în condiții de câmp.

3.2. Experiențe în condiții de câmp

Atât din publicațiile bibliografice cât și din propria experiență de cercetare cunoaștem faptul că rezultatele experiențelor vegetative obținute în condiții de laborator diferă de cele a experiențelor

efectuate în câmp. Diferența este motivată prin condițiile diferite în cele 2 cazuri.

Cu toate acestea experiențele efectuate în condiții de laborator sunt extrem de utile pentru planificarea și realizarea experiențelor de teren. De aceea luând drept bază experiența acumulată în condiții de laborator a fost montată o experiență analogică în condiții de câmp pe teritoriul Bazei Experimentale a ASM cu includerea tuturor variantelor microbiologice experimentate în condiții de laborator. În calitate de plantă-gază a fost folosită soia, soiul Aura. Toate variantele, inclusiv varianta „martor” au fost puse în câte 4 repetări fiind respectate toate cerințele agrotehnice, fitotehnice, microbiologice. Dimensiunile parcelelor în fiecare repetare au fost de 3,15 m x 2,50 m (7,87 m²), suprafața ocupată de fiecare variantă - 31,5 m², iar suprafața totală a experienței - 156 m².

În perioada de îmbobocire - înflorire a plantelor de soia au fost luate probele necesare pentru determinarea gradului de colonizare a solului și sistemului radicular, iar la finisarea experienței - (luna octombrie) au fost luați în evidență ceilalți indici necesari pentru aprecierea eficacității tulpinilor de bacterii utilizate în experiență. Cu toate că a.2009 a fost un an secetos, cu temperaturi ridicate, condiții în general nefavorabile pentru cultivarea soiului în experiență plantele s-au dezvoltat normal fiind afectate parțial din cauza secetei numai păstăile de la vârful plantelor.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 3

Tabelul 3. Colonizarea solului și sistemului radicular al plantelor de soia de către tulpinile bacteriilor *Pseudomonas sp.* BSSg și RRA8 în condiții experimentale de câmp.

Varianta	Numărul de celule la 1g/sol	Numărul de celule la 1g/rădăcini
Tulpina BSSg		
Martor	1x10 ⁶	5x10 ⁷
BSSg	3x10 ⁵	3,5x10 ⁷
Tulpina RRA8		
Martor	0	0
RRA8	0	0

Din datele obținute referitor la colonizarea solului și sistemului radicular al plantelor (tab.3) s-au constatat următoarele:

- tulpina *Pseudomonas BSSg* (stimuloare a procesului de creștere) în martor a fost înregistrată în număr de 1 mln cel. la 1 g sol și 50 mln la 1 g rădăcini. În cazul plantelor inoculate numărul de celule a inoculatului a fost de 300 mii la 1 g sol și 35 mln la 1 g rădăcini;

- tulpina RRA8 nu a colonizat nici solul și nici sistemul radicular al plantelor.

Dacă referitor la datele obținute pentru tulpina RRA8 nu apar întrebări apoi privitor la tulpina BSSg se cere explicație în ceea ce privește prevalarea numerică de celule în martor față de varianta inoculată. Acest fenomen ar putea fi explicat prin aceea că tulpina BSSg în rezultatul tratării cu antibioticul streptomycină a devenit mai puțin capabilă de a concura cu tulpinile aborigene morfologic asemănătoare cu tulpina folosită pentru inoculare. În tabelul 4 sunt incluse datele referitor la

procesul de dezvoltare a plantelor pe parcursul perioadei de vegetație în condiții de câmp.

Rezultate satisfăcătoare au fost obținute la tratarea semințelor cu tulpina RRA8. În cazul utilizării tulpinii BȘSg masa plantelor a fost sub nivelul matorului. Tabelul 5 este dedicat productivității de nodozități și, respectiv, activității lor. Conform datelor obținute în toate variantele rezultatele sunt superioare față de mator.

Datele referitor la formarea păstăilor și recoltei de boabe sunt reflectate în tabelul 6. Și în acest caz rezultatele sunt superioare față de matorul absolut și tulpina-etalon cu excepția numărului de

păstăi în varianta BȘSg fapt ce a determinat formarea unei recolte mai mici în acest caz față de tulpina RRA8 dar, totuși, și aici recolta de boabe a fost mai mare decât în variantele mator. Explicația în ceea ce privește numărul mai mic de păstăi atât valoroase cât și fără boabe (sau cu boabe nedezvoltate) este următoarea: soia este o cultură de climă cu umiditate sporită, care pentru o dezvoltare normală a păstăilor și respectiv – a boabelor are nevoie de o umiditate optimă a aerului. În condițiile Moldovei și, în special, în anii secetoși păstăile nedezvoltate sunt destul de frecvente și pot duce chiar la compromiterea recoltei.

Tabelul 4. Influența microorganismelor stimulative asupra productivității la soia. Experiența de câmp, a.2009.

Varianta	Înălțimea plantelor, cm, M ± m	Adaos față de mator, %	Masa brută la 5 plante, gr M ± m	Adaos față de mator, %	Masa uscată la 5 plante, gr M ± m	Adaos față de mator, %
1	2	3	4	5	6	7
Mator	49,7±2,1	-	168,1±21,9	-	52,0 ±7,0	-
646a	53,4±2,8	7,4	202,3±53,0	20,4	60,8 ±15,7	16,8
BȘSg	50,9±3,7	2,4	162,8±15,2	-3,2	49,8 ±6,2	-4,3
RRA8	54,8±2,2	10,3	207,5±30,7	23,5	61,9 ±6,4	19,0

Tabelul 5. Influența microorganismelor stimulative asupra formării și activității aparatului rhizobio-bacterian la soia. Experiența de câmp, a. 2009 (Masa brută și uscată a nodozităților calculată la 5 plante).

Varianta	Numărul de nodozități, buc. M ± m.	Masa brută a nodozități g M ± m	Adaos față de mator, %	Masa uscată a nodozități, g M ± m	Adaos față de mator, %	Fixarea N ₂ atmosferic, mkg N ₂ /pl./oră	Activitatea potențială mkg N ₂ /g sol./24 ore
1	2	3	4	5	6	7	8
Mator	45,5±24.1	0,65±0.3	-	0,22796±0.1	-	30,6	7,5
646a	37,5±28.1	0,95±0.5	46,1	0,30438±0.2	33,5	85,4	9,9
BȘSg	57,0±39.9	0,99±0.5	52,3	0,33938±0.2	48,9	80,0	8,4
RRA8	24,8±27.2	0,74±0.6	13,8	0,24410±0.2	7,1	67,7	9,5

Tabelul 6. Influența bacteriilor de rizosferă asupra formării păstăilor și a recoltei de boabe la soia în experiența de câmp, a.2009 (media la 20 plante).

Varianta	Total păstăi, buc. M ± m	Adaos față de martor, %	Păstăi valoroase, buc. M ± m	Adaos față de martor, %	Recolta, g M ± m	Adaos față de martor, %
<i>I</i>	3	4	5	6	7	8
Martor	200,75±49,7		163,00±40,4		30,71±5,4	-
646a	208,50±36,9	3,9	161,30±24,7	-1,1	36,48±3,6	18,8
BȘSg	180,00±24,5	-10,3	157,00±25,1	-3,7	38,43±3,2	25,2
RRA8	231,00±66,1	15,1	174,80±38,2	7,2	42,07±9,0	37,0

CONCLUZII

Analizând în ansamblu rezultatele obținute atât în condiții de laborator cât și, în special, în condiții de câmp pot fi făcute următoarele concluzii:

1. Tulpina BȘSg aflată în proces de cercetare este capabilă de a concura cu microflora autohtonă din sol colonizând satisfăcător atât sistemul radicular cât și solul din zona de rizosfera a plantei;

2. Tulpina RRA8 nu concurează cu microflora autohtonă din sol și nu colonizează zona de rizosfera a plantei (cel puțin în condiții de secetă), atât sistemul radicular, cât și solul;

3. Din punct de vedere al influenței asupra proceselor de creștere, dezvoltare și productivitate cele mai bune rezultate atât în condiții vegetative de laborator cât și de câmp au fost obținute în varianta RRA8.

Bibliografie

- 1. Scocinscaia N.N., Antipciuc A.F.** C voprosu o coloniziruiushchei sposobnosti bakterij pada Azotobacter// *Microbiol. J.* 1993 .55, №3, s.44-47.
- 2. Gargulea A.D., Babici L.V., Kiprianova E.N., Smirnov V.V.** Sposobnost' razlicnyh vidov bakterij roda Pseudomonas c colonizatzii cornej pșenitzy.// *Microbiol.j.*, 1988, 50, №6, s. 77-81.
- 3. Bowen G.D., Rovira A.D.** Microbial colonization of plant roots // *Ann. Rev. Phytopathol.*, 1976, -14, p. 121-144.
- 4. Vozneacovskaia Iu.M.** Microflora pastenij i urozhai // *L.Kolos*, 1969. 240 s.
- 5. Dospheov B.A.** Metodica polevogo opyta.// *M. Kolos*, 1979. 412s.
- 6. Scher., Ziegler J. S., Kloepper J.W.** A method for assaying the root – colonizing capacity of bacteria on maize//*Can. J. Microbiol.* 1984, 30, №. 2.