

THE EFFECT OF COMBINED MICROBIAL PREPARATIONS ON THE BIOMASS PRODUCTION OF SOYBEAN (*GLYCINE MAX*)

VLIV KOMBINOVANÝCH MIKROBIOLOGICKÝCH PŘÍPRAVKŮ NA PRODUKCI BIOMASY SÓJI (*GLYCINE MAX*)

Plšková M.¹, Kieu T. V.¹, Mikanová O.², Šimon T.²

¹Ústav půdoznalství a mikrobiologie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

²Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně, Česká republika.

E-mail: plskova@mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of combined microbial preparations on the biomass production of soybean (*Glycine max*), infection of roots by arbuscular mycorrhizal fungi (AM fungi) and nitrate reductase activity of nodule bacteria. Plants were inoculated with AM fungus *Glomus mosseae* and phosphate-solubilising nodule bacteria *Bradyrhizobium japonicum* with and without rock phosphate. Mycorrhizal infection of roots and biomass production was significantly higher when plants were co-inoculated with *G. mosseae* and *B. japonicum* than uninoculated plants or plants inoculated alone. Addition of rock phosphate increased mycorrhizal infection of uninoculated plants and on the other hand decreased mycorrhizal infection of co-inoculated plants. Addition of rock phosphate had no significant impact on biomass production. Nitrate reductase activity was the highest when plants were inoculated with nodule bacteria alone, but co-inoculation with AM fungus and addition of rock phosphate significantly decreased nitrate reductase activity of nodule bacteria.

Keywords: soybean, arbuscular mycorrhiza, nitrate reductase activity, phosphorus

ABSTRAKT

Cílem práce bylo posoudit vliv kombinovaných mikrobiologických přípravků na produkci biomasy sóji (*Glycine max*), mykorhizní kolonizaci kořenů sóji a nitrogenázovou aktivitu hlízkových bakterií. K inokulaci rostlin byla použita arbuskulo-mykorhizní houba (AM houba) *Glomus mosseae* a hlízkové bakterie *Bradyrhizobium japonicum* s fosfor-solubilizační aktivitou v kombinaci s přísadkou a bez přísadky fosforu. Rostliny sóji kombinovaně inokulované AM houbou a hlízkovými bakteriemi měly na kořenech vyšší procento mykorhizní infekce a vytvořily více rostlinné biomasy než rostliny samostatně inokulované nebo neinokulované. Přísadka fosforu zvýšil procento mykorhizní infekce kořenů u rostlin neinokulovaných a naopak snížil u rostlin kombinovaně inokulovaných AM houbou a hlízkovými bakteriemi. Na tvorbu rostlinné biomasy neměl přísadka fosforu významnější vliv. Nejvyšší nitrogenázová

aktivita rhizobií byla u rostlin samostatně inokulovaných hlízkovými bakteriemi, ale při kombinaci s AM houbou a po přidavku fosforu se nitrogenázová aktivita rhizobií výrazně snížila.

ÚVOD

V souvislosti s rozvojem trvale udržitelného zemědělství se stále více pozornosti obrací na možnost využití mikrobiálních inokulantů při pěstování rostlin, což následně může omezit zdravotní a environmentální rizika vyplývající z nadměrných vstupů chemických látek do půdy při tradičním hospodaření (Vázquez et al., 2002). Arbuskulo-mykorhizní houby (AM houby) jsou významnou součástí půdní bioty. Přítomnost mykorhizní infekce na kořenech rostlin působí pozitivně na vzcházení a růst rostlin, zvyšuje jejich odolnost proti působení biotických a abiotických stresových faktorů, zlepšuje koloběh živin a tvorbu půdní struktury. Mycelium AM hub, které infikuje rhizosféru půdy a kořeny rostlin je v těsném kontaktu s ostatní půdní mikrobiotou. Tento těsný vztah s půdními mikroby může stimulovat nebo inhibovat tvorbu mykorhizní infekce a může selektivně ovlivnit rozvoj AM hub. Mikrobiální interakce je mimořádně zajímavá v případě rhizobií, která fixují vzdušný N_2 , protože jak rhizobia, tak AM houby symbioticky kolonizují kořenový systém luskovin. V různých systémech mikrosymbiont-luskovina může kompatibilní kombinace mikrobiálních inokulantů (např. rhizobia fixující vzdušný N_2 a AM houby) zvýšit jejich pozitivní účinek na rostliny (Biró et al., 2000). Cílem práce bylo posoudit vliv kombinovaných mikrobiologických přípravků (AM houby *Glomus mosseae* a hlízkových bakterií *Bradyrhizobium japonicum* s fosfor-solubilizační aktivitou) na produkci biomasy sóji (*Glycine max*), mykorhizní kolonizaci kořenů sóji a nitrogenázovou aktivitu hlízkových bakterií.

MATERIÁL A METODY

Nádobový pokus s rostlinami sóji měl následující varianty: 1. Kontrola bez inokulace a bez přidavku fosforu (Ko), 2. Kontrola s přidavkem fosforu (Ko+P), 3. Inokulace hlízkovými bakteriemi (Rh), 4. Inokulace hlízkovými bakteriemi s přidavkem fosforu (Rh+P), 5. Inokulace AM houbou (AM), 6. Inokulace AM houbou s přidavkem fosforu (AM+P), 7. Kombinovaná inokulace hlízkovými bakteriemi a AM houbou (Rh+AM), 8. Kombinovaná inokulace hlízkovými bakteriemi a AM houbou s přidavkem fosforu (Rh+AM+P). Každá varianta měla 8 opakování.

Půda do pokusných nádob byla odebrána na pozemku VÚRV v Praze-Ruzyni a plněna do 5 l nádob. Chemickou analýzu půdy provedl ÚKZÚZ, regionální laboratorní oddělení v Liberci a její výsledky jsou uvedeny v tab.1. Fosfor byl do půdy aplikován ve formě KH_2PO_4 v množství 0,40 g na nádobu. Mykorhizní inokulum, obsahující reprodukční částice (spóry, půdní mycelium, kolonizované části kořenů) AM houby *Glomus mosseae* (BEG 25) bylo aplikováno do půdy před výsevem semen v množství 25 ml na nádobu. Inokulum hlízkových bakterií bylo

získáno ze sbírky VÚRV v Praze-Ruzyni a obsahovalo 4 kmeny bakterií *Bradyrhizobium japonicum* (D 563, D 504, D 538, D 574) s prokázanou fosfor-solubilizační aktivitou (Štorkánová a kol., 1999). Kmeny rhizobií byly samostatně kultivovány v tekutém YEM médiu (yeast extract-mannitol) a k inokulaci bylo použito 30 ml kultury (1×10^9 CFU/ml) na nádobu těsně před setím.

Tab. 1: Výsledky chemické analýzy půdy

Druh půdy	pH/CaCl ₂	P (aa) mg.kg ⁻¹	K (aa) mg.kg ⁻¹	Ca (aa) mg.kg ⁻¹	Mg (aa) mg.kg ⁻¹	CaCO ₃ %	C %	N %	S ppm
střední	7,3	145	237	7168	208	2,40	1,405	0,147	131,2

V každé pokusné nádobě bylo vyseto 10 semen sóji (*Glycine max*, odrůda Korada) a po vzejití byly v každé nádobě ponechány 3 rostliny. Nádobky byly v průběhu pokusu umístěny ve vegetační hale VÚRV v Praze-Ruzyni a byly pravidelně zavlažovány deionizovanou vodou. Rostliny sóji byly sklizeny v době květu, 66 dní od výsevu semen. Nadzemní hmota byla oddělena, vysušena při 60° C do konstantní hmotnosti a zvážena. Kořeny byly použity ke stanovení celkové nitrogenázové aktivity (TNA) nepřímou metodou redukce acetyleny na ethylen (Hardy et al., 1973). Pro hodnocení mykorhizní infekce uvnitř kořenů byla použita metoda barvení endomykorhizních kořenů (Phillips a Hayman, 1970, v modifikaci Koske a Gemma, 1989) a procento kolonizace kořenů bylo stanoveno mikroskopicky preparátovou metodou (slide method) (Giovannetti a Mosse, 1980). Kořenová hmota byla vysušena při 60° C do konstantní hmotnosti a zvážena.

Získané výsledky byly statisticky zpracovány (Statgraphic, ANOVA, $P < 0,05$).

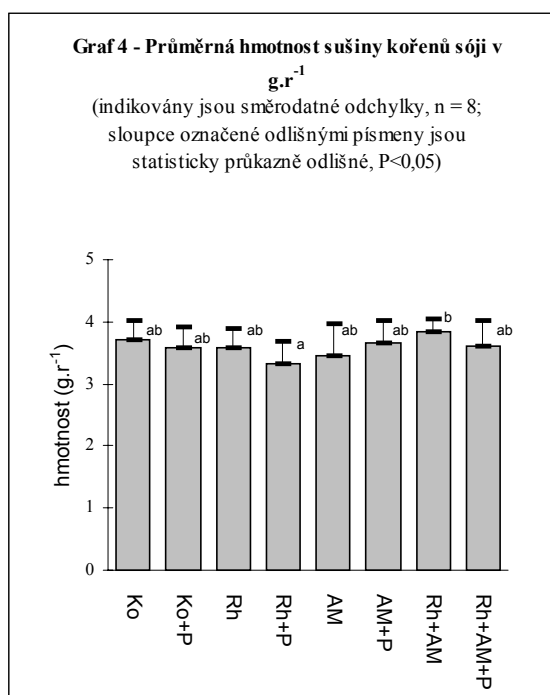
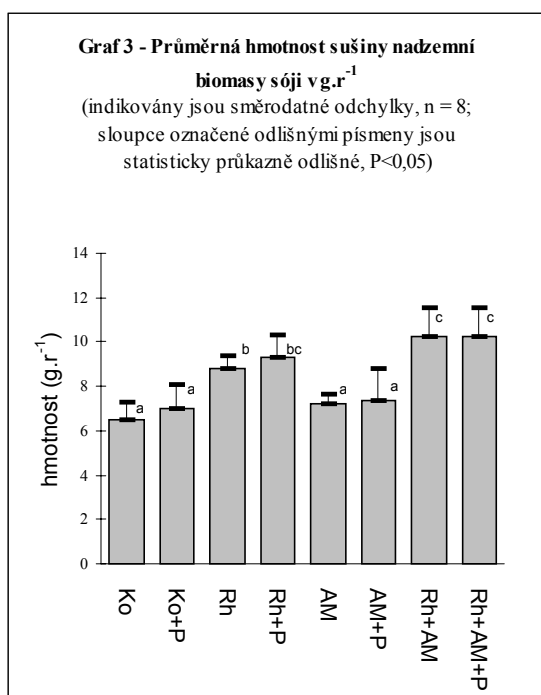
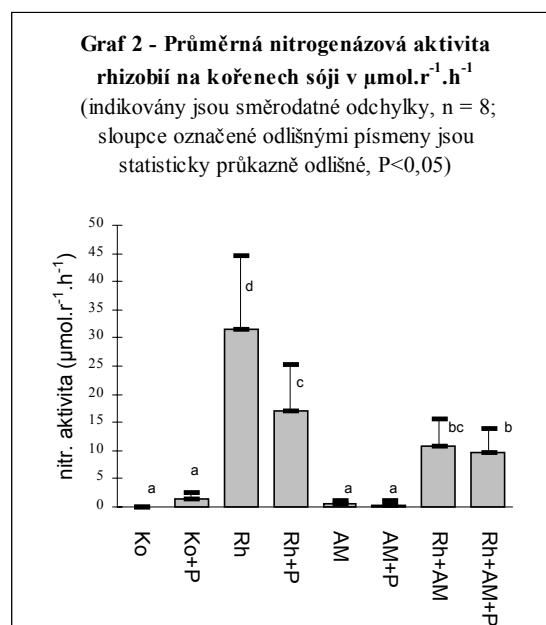
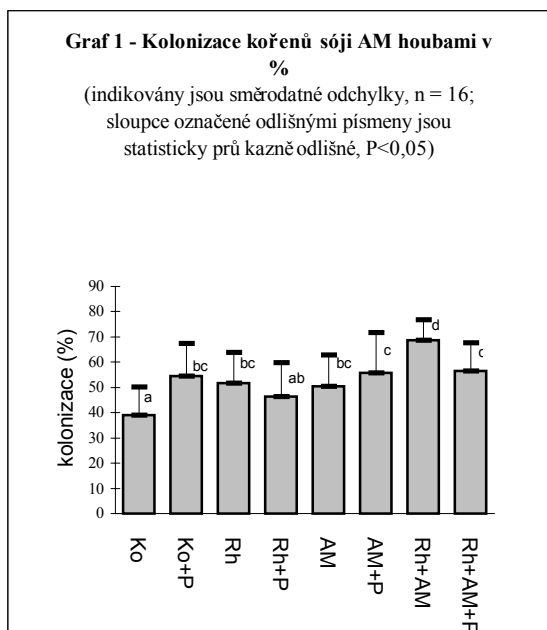
VÝSLEDKY A DISKUSE

Nejnižší procento kolonizace kořenů sóji AM houbou bylo u kontrolní varianty bez inokulace a bez přídatku fosforu (38,94 %). Na mykorhizní infekci kořenů kontrolních rostlin se pravděpodobně podílely propagule (spóry, půdní mycelium, kolonizované části kořenů) indigenních AM hub v půdě. Statisticky významně vyšší procento mykorhizní kolonizace bylo u variant samostatně nebo kombinovaně inokulovaných bakteriemi *B. japonicum*, AM houbou *G. mosseae* a u variant s přídatkem fosforu (graf 1). U kontrolní varianty s přídatkem fosforu došlo ke zvýšení mykorhizní kolonizace o 15,56 %. Příklad fosforu mohl v tomto případě aktivovat větší množství propagulí arbuskulárních hub přirozeně přítomných v půdě k vytvoření mykorhizní infekce uvnitř kořene. Velmi nízká dávka přístupného fosforu může potlačit mykorhizní kolonizaci a rostlinný růst, v některém případě však malý přídatok fosforu může procento kolonizace a rostlinný růst zvýšit (Bolan et al., 1984). Nejvyšší procento mykorhizní infekce kořenů bylo u rostlin kombinovaně inokulovaných hlízkovými bakteriemi a AM houbou

(68,81 %) a statisticky významně se lišilo od ostatních variant. Jak fixátoři vzdušného dusíku tak mykorhizní houby osidlují vnitřek kořenového systému, proto mezi nimi musí existovat funkční vztah. V případě rhizobií probíhá fixace vzdušného dusíku odděleně uvnitř hlízek, což může být příčinou, že si rhizobia a AM houby vzájemně nekonkurují (Ames a Bethlenfalvay, 1987). Také morfologické a fyziologické změny kořenů rostlin při kombinované inokulaci mohou přispět k vyšší mykorhizní infekci.

U rostlin bez inokulace hlízkovými bakteriemi *B. japonicum* byla průměrná nitrogenázová aktivita rhizobií celkově nižší, než u rostlin inokulovaných (graf 2). Nejvyšší průměrná nitrogenázová aktivita rhizobií byla u rostlin samostatně inokulovaných bakteriemi *B. japonicum* ($31,50 \mu\text{mol.r}^{-1}.\text{h}^{-1}$) a statisticky významně se lišila od ostatních variant. U rostlin inokulovaných hlízkovými bakteriemi v kombinaci s AM houbou nebo s přidavkem fosforu byla průměrná nitrogenázová aktivita nižší. Přídavek P a inokula AM houby do půdy mohl inhibovat nitrogenázovou aktivitu hlízkových bakterií. Chaturvedi a Kumar (1991) zaznamenali vyšší tvorbu hlízek a nitrogenázovou aktivitu u cizrny (*Cicer arietinum* L) v nesterilní a na P chudé půdě. Snížení nitrogenázové aktivity rhizobií u rostlin kombinovaně inokulovaných hlízkovými bakteriemi a AM houbou mohlo být způsobeno vyšším procentem mykorhizní kolonizace kořenů. AM houba mohla rostlině v dostatečné míře zajistit její požadavky na dusík a fosfor, a tím snížit symbiotickou fixaci vzdušného N_2 prostřednictvím hlízkových bakterií. Reinhard a kol. (1993) došli k závěru, že mykorhizní infekce nemá vliv na počet hlízek u hrachu (*Pisum sativum* L), ale výrazně snižuje nitrogenázovou aktivitu hlízkových bakterií *Rhizobium leguminosarum*.

Nejvyšší průměrná hmotnost sušiny nadzemní biomasy byla u rostlin kombinovaně inokulovaných bakteriemi *B. japonicum* a AM houbou *G. mosseae* ($10,27 \text{ g.r}^{-1}$) a statisticky významně se lišila od ostatních variant s výjimkou varianty kombinovaně inokulované hlízkovými bakteriemi a AM houbou s přidavkem fosforu a varianty inokulované hlízkovými bakteriemi s přidavkem fosforu (graf 3). Vyšší průměrná hmotnost sušiny nadzemní biomasy při kombinované inokulaci hlízkovými bakteriemi a AM houbou může být způsobena zvýšeným příjmem živin, především dusíku a fosforu. Inokulace rhizobii zvyšuje fixaci N_2 ze vzduchu, zatímco inokulace AM houbou pravděpodobně zvyšuje příjem N a P z půdy. Kombinovaná inokulace rostlin AM houbou a rhizobii s fosfor-solubilizační aktivitou může zvýšit schopnost rostlin získávat P z nedostupných forem. Nejvyšší průměrná hmotnost sušiny kořenů sóji byla u rostlin kombinovaně inokulovaných bakteriemi *B. japonicum* a AM houbou *G. mosseae* ($3,83 \text{ g.r}^{-1}$) a statisticky významně se lišila pouze od nejnižší průměrné hmotnosti sušiny kořenů sóji u rostlin inokulovaných hlízkovými bakteriemi s přidavkem fosforu. Mezi zbylými variantami nebyl statisticky průkazný rozdíl v průměrné hmotnosti sušiny kořenů (graf 4).



ZÁVĚR

Z uvedených výsledků vyplývá, že rostliny sóji (*Glycine max*) kombinovaně inokulované AM houbou *G. mosseae* a hlízkovými bakteriemi *B. japonicum* měly na kořenech vyšší procento mykorhizní infekce a vytvořily více rostlinné biomasy než rostliny samostatně inokulované nebo neinokulované. Přídavek fosforu se projevil zvýšením procenta mykorhizní infekce kořenů u rostlin neinokulovaných a naopak snížením u rostlin kombinovaně inokulovaných AM houbou a hlízkovými bakteriemi. Na tvorbu rostlinné biomasy neměl přídavek fosforu významnější vliv. Nejvyšší nitrogenázová aktivita rhizobií byla u rostlin samostatně inokulovaných hlízkovými bakteriemi, ale při kombinaci s AM houbou a po

přídavku fosforu se nitrogenázová aktivita rhizobií výrazně snížila. Rostliny, které nebyly inokulovány hlízkovými bakteriemi, měly nitrogenázovou aktivitu rhizobií zanedbatelnou.

POUŽITÁ LITERATURA

Ames, R. N., Bethlenfalvay, G. J., 1987. Localised increase in nodule activity, but no competitive interaction of cowpea rhizobia due to pre-establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *New Phytol.* 106: 207-215.

Biró, B., Köves-Péchy, K., Vörös, I., Takács, T., Eggenberger, P., Strasser, R. J., 2000. Interrelations between *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers and arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of alfalfa in sterile, AMF-free or normal soil conditions. *Applied Soil Ecology* 15:159-168.

Bolan, N. S., 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil* 134: 189-207.

Giovannetti, M., Mosse, B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84: 489-500.

Hardy, R. W. F., Burns, R. C., Holsten, R. D., 1973. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.* 5: 47-81.

Chaturvedi, C., Kumar, A., 1991. Nodulation and nitrogenase activity in gram (*Cicer arietinum* L) as influenced by *Rhizobium* and VA mycorrhiza interaction. *National Academy Science Letters-India* 14 (7): 289-292.

Koske, R. E., Gemma, J. N., 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research* 92: 486-505.

Phillips, J. M., Hayman, D. S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.

Reinhard, S., Martin, P., Marschner, H., 1993. Interactions in the tripartite symbiosis of pea (*Pisum sativum* L), *Glomus* and *Rhizobium* under nonlimiting phosphorus supply. *Journal of Plant Physiology* 141: 7-11.

Štorkánová, G., Voříšek, K., Mikanová, O., Randová, D., 1999. P-solubilizační aktivita kmenů rodu *Rhizobium*. *Plant Production* 45: 403-406.

Vázquez, M. M., Barea, J. M., Azcón, R., 2002. Influence of arbuscular mycorrhizae and a genetically modified strain of *Sinorhizobium* on growth, nitrate reductase activity and protein content in shoots and roots of *Medicago sativa* as affected by nitrogen concentrations. *Soil Biology & Biochemistry* 34: 899-905.