

UTICAJ SOJEVA ODREĐENIH VRSTA RIZOBIA NA AZOTFIKSACIONU SPOSOBNOST ZELENE VIGNE, *VIGNA RADIATA* (L.) WILCZEK

Dušica Delić, Olivera Stajković, Nataša Rasulić, Đorđe Kuzmanović,
Radmila Pivić, Dragana Jošić, Bogić Miličić

Institut za zemljište, Beograd.

Izvod: Ispitana su simbiozna svojstva rizobialnih sojeva na zelenoj vigni, *Vigna radiata*, gajenoj u sudovima sa sterilnim peskom, u polu-kontrolisanim uslovima, u staklari. Korišćeno je 11 sojeva/izolata rizobia iz Kolekcije Instituta za zemljište, Beograd i to 4 soja *B. japonicum*, 1 soj *Bradyrhizobium spp.*, 4 soja *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* i jedan autohtoni izolat "Knj" izolovan sa njive u Krnješevcima (Srem). Prisustvo pojedinačnih, krupnih nodula je zabeleženo na prvoj trećini korena biljaka inokulisanih sojevima *B. japonicum*, dok je izolat "Knj" formirao više grozdastih nodula, srednje veličine, raspoređenih po celom korenovom sistemu. Ostali sojevi nisu nodulisali zelenu vignu osim slabe nodulacije sojem 2001 (1-2 nodule/biljci). Na osnovu prosečnih vrednosti suve nadzemne mase, sadržaja ukupnog i fiksiranog azota izdvojile su se biljke inokulisane sojevima *B. japonicum* i izolatom "Knj". Značajnom efikasnošću u azotofiksaciji se naročito istakao soj 542 koji sa sojem 532 i izolatom "Knj" predstavlja potencijalne agense mikrobiološkog N đubriva.

Ključne reči: *Vigna radiata*, rizobium, nodulacija, simbiotska efikasnost

Uvod

Zelena vigna (*Vigna radiata*), jednogodišnja zrnasta leguminoza poreklom iz Indije, rasprostranjena je na područja južne i jugoistočne Azije kao i tropskih i subtropskih predela Australije, Afrike i Amerike (Myers, 2000). Karakteriše je visok sadržaj sirovih proteina (21-25%) i ugljenih hidrata (>50%), nizak sadržaj masti (<1,5%), prisustvo određenih vitamina, minerala, amino-kiselina i enzima (Rahman et al., 2002). Visoka hranljiva vrednost (klijanci sadrže i do 28% proteina) i laka svarljivost omogućavaju joj da se prvenstveno koristi u vegetarijanskoj i dijetetskoj ishrani ljudi (Islam et al., 1999). Osim toga može da se koristi kao stočna hrana i zeleniše đubrivo (Oplinger et al., 1990; Myers, 2000). Njen veliki ekonomski značaj, naročito u zemljama u razvoju, ogleda se u poboljšanju kvaliteta zemljišta, sposobnosti rasta u aridnim područjima i smanjenju ili odsustvu primene mineralnog azotnog (N) đubriva zahvaljujući sposobnosti da vrši azotofiksaciju sa specifičnim kvržičnim bakterijama (rizobie) *Bradyrhizobium spp.* (Islam, 1999; Rahman et al., 2002; Myers, 2000). Velika sličnost u načinu gajenja i primenjenoj agrotehnici sa sojom omogućavaju uvođenje ove leguminoze u poljoprivrednu proizvodnju Srbije (Myers, 2000) naročito ako se uzme u obzir da svetska iskustva ukazuju da raznovrsnost useva utiče na raznovrsnost poljoprivredne proizvodnje (Zerhari et al., 2000).

Zelena vigna fiksira N_2 u simbiozi sa određenim sojevima bakterija roda *Bradyrhizobium* (Jorda, 1984; Tien et al., 2002; Herridge et al., 2005) što pozitivno utiče na kvantitet i kvalitet biljne produkcije i smanjuje ili izostavlja primenu N mineralnog đubriva (Hafeez et al., 1988; Oplinger et al., 1990; Rahman et al., 2002). Autohtone populacije rizobia u simbiozi sa biljkom domaćinom fiksiraju N_2 različitom efikasnošću zavisno od njihove gustine i aktivnosti u zemljištu (Vojinović et al., 1989). Primena inokulacije biljke domaćina efektivnim sojevima, kao važne agrotehničke mere u poljoprivrednoj proizvodnji, povećava intenzitet azotofiksacije i zadovoljava potrebe biljke za N (Vlassak and Vanderleyden, 1997; Herridge et al., 2005).

Vrsta *B. japonicum* i specifični sojevi *Bradyrhizobium spp.* formiraju nodule na *V. radiata* (Jorda, 1984; Drevon et al., 1987; Gottfert et al. 1990; Herridge et al., 2005; Yokoyama et al., 2006). S obzirom na ovu činjenicu kao i da je *Phaseolus aureus* ili *Phaseolus mungo* sinonim za *V. radiata* (Haq, et al., 2005), predmet istraživanja našeg rada je bio testiranje azotofiksacione sposobnosti određenih sojeva roda *Bradyrhizobium* i *Rhizobium* lrguminosarum biovar. phaseoli u simbiozi sa *Vigna radiata*, sa ciljem njihove primene u formi mikrobiološkog azotnog đubriva.

Materijal i metode

Korišćeno je 11 sojeva određenih vrsta rizobia Kolekcije Instituta za zemljište, Beograd (Tabela 1). Sojevi su odabrani prema pokazanoj visokoj efikasnosti u prethodnim ogledima. Biljka domaćin je bila zelena vigna, *Vigna radiata* čije je seme dobijeno od kompanije za oplemenjivanje i semenarstvo "Selsem", Beograd.

Tabela1. Vrste rizobia primenjenih kao inokulumi za zelenu vignu, *Vigna radiata* (L.) Wilszek

Table1. Species of rhizobia used as inoculums for mung bean, *Vigna radiata* (L.) Wilszek

Rod Genera	Vrsta Species	Soj Strain	Izvor Source
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i>	542	Kolekcija Instituta
		532	
		525	
		526	
	<i>B. spp</i>	"Knj"	autohtoni izolat sa njive, lokalitet Krnješevci (Srem)
		2001	dobijen iz Brazila putem razmene, specifičan za vignu
<i>Rhizobium</i>	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	110	Kolekcija Instituta
		116	
		120	
		121	
		126	

Nodulaciona i simbiozna svojstva sojeva rhizobia su testirana na zelenoj vigni gajenoj u sudovima sa sterilnim peskom, u polu-kontrolisanim uslovima u staklari (Vincent, 1970). Pre setve semena su površinski sterilisana u 96% alko-holu i 2 % $HgCl_2$. U svaku saksiju je zaejano po 10 semenki koje su inokulisane ispitivanim sojevima. Nakon nicanja broj biljaka po saksiji je sveden na 5. Ogled

je izveden u tri ponavljanja sa 11 tretmana sa inokulacijom (sojevi navedeni u tabeli 1) i 2 kontrolna tretmana bez inokulacije, primenom randomiziranog blok sistema. Biljke u tretmanima sa inokulacijom su inokulisane suspenzijom čiste kulture ispitivanih sojeva starosti 5 dana. Sojevi su gajeni u sterilnom YMB rastvoru. Prvi kontrolni tretman (Ø) obuhvatio je biljke bez inokulacije i bez azota, a drugi (NØ) biljke bez inokulacije ali sa punom normom azota tj. 500 mg/l u formi KNO₃. Biljke su po potrebi zalivane sterilnom destilovanom vodom. Svakog petnaestog dana tretmani sa inokulacijom i Ø- kontrola su zalivani sterilnim Jensenovim rastvorom bez azota, a NØ- kontrola zalivani punom normom azota. Eksperiment je završen posle 6 nedelja u fazi trećeg trolista kod NØ. Određena je težina suve biljne mase kao i procenat azota u njoj metodom Kjeldahl-a. Na osnovu dobijenih rezultata je izračunat sadržaj ukupnog i fiksiranog N po biljci. Rezultati su statistički obrađeni LSD-testom i Dankanovim testom.

Rezultati i diskusija

Prisustvo nodula na prvoj trećini korena zabeleženo je samo na korenu biljaka inokuliranih sojevima *B. japonicum* (Tabela 2). Ostali sojevi nisu nodulisali zelenu vignonu osim slabe nodulacije sojem 2001 (1-2 nodule/biljci). Vizuelna ocena nodulacije je potvrđena statističkom obradom vrednosti ispitivanih parametara datih u Tabeli 2.

Tabela 2. Prosečne vrednosti ispitivanih parametara zelene vigne, *Vigna angularis* kao indikatora efikasnosti određenih sojeva rizobia

Table 2. Average values of investigated parameters of mung bean, *Vigna angularis* indicating efficiency of particular rhizobial strains

Tretmani Treatments	Težina suve biljne mase Shoot dry weight mg plant ⁻¹	%N	Ukupan sadržaj N Total N content mg plant ⁻¹	Sadržaj fiksiranog azot Fixed N content mg plant ⁻¹	Nodulacija Nodulation
542	596 a	1,33	7,93 a	6,47 a	+
"Knj"	515 a	1,08	5,56 b	4,10 b	+
532	487 a	1,16	5,65 b	4,19 b	+
525	393 b	1,13	4,44 b	2,98 c	+
526	390 b	1,10	4,29 b	2,83 c	+
2001	302 c	0,87	2,63 c	1,17 d	+
110	277 c	0,77	2,13 c	0,67 d	-
116	272 c	0,90	2,49 c	1,03 d	-
120	264 c	0,71	1,87 c	0,41 d	-
121	228 c	0,83	1,89 c	0,43 d	-
126	207 c	0,77	1,59 c	0,13 d	-
NØ	509 a	1,13	5,75 b		
Ø	206 c	0,71	1,46 c		
LSD	0,05	88,49	1,02	1,00	
	0,01	116,48	1,70	1,57	

NØ- kontrola sa punom normom azota; Ø- kontrola bez azota; a-d: vrednosti praćene istim slovom se na osnovu Dankanovog testa ne razlikuju statistički na nivou značajnosti 5% (p#0.05).

NØ-control with full N content; Ø-control without N; a-d: Means in a column followed by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test at the 5% level (p#0.05).

Na osnovu prosečnih vrednosti suve nadzemne biljne mase, sadržaja ukupnog i fiksiranog azota značajno se izdvajaju biljke inokulisane sojevima *B. japonicum* i izolata "Knj" od biljaka inokulisanih ostalim ispitivanim sojevima i kontrole bez inokulacije ($\emptyset$). Najveći prinos suve nadzemne biljne mase i sadržaj ukupnog i fiksiranog azota konstatovan je kod biljaka inokulisanih sojem 542 (596 mg/bilj.). U pogledu prinosa one se statistički nisu razlikovale od biljaka inokulisanih sojevima 532 i "Knj" i od kontrole sa punom normom azota ($N\emptyset$) što znači da su sojevi 542, 532 i "KNJ" u procesu azotofiksacije ostvarili prinos koji može da zadovolji optimalnu potrebu biljke za azotom. Sojevi 525 i 526 su u simbioznoj zajednici dali značajno niži prinos. Veoma niske vrednosti težine suve nadzemne mase (207-277mg/bilj.) imale su biljke inokulisane sojevima *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* koji nisu pokazali sposobnost nodulacije zelene vigne. Najniži prinos suve mase od 206 mg/bilj. imala je kontrola bez azota i inokulacije ($\emptyset$).

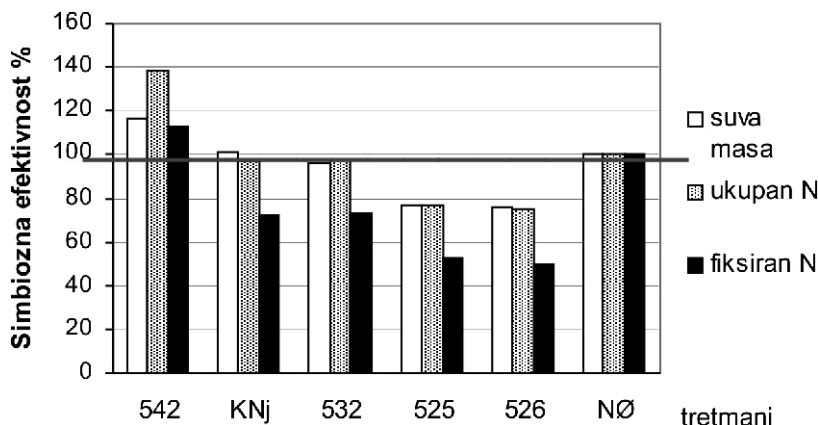
Prinos suve biljne mase je u korelaciji sa efikasnošću azotofiksacije (Yadav et al., 1999). Ako se kao kriterijum efikasnosti primeni mišljenje Pochona (1954) da su efektivni azotofiksatori oni koji ostvaruju težinu suve mase 2.5 puta veću od kontrole (Vojinović i sar., 1989), tada se sojevi 542 i "KNJ" mogu karakterisati kao efikasni. Soj 532 se od njih, prema prinosu suve mase, statistički nije razlikovao mada se prema kriterijumu Pochona ne karakterise kao efikasan soj.

Sadržaj ukupnog (7.93mg/bilj.) i fiksiranog azota (6.47mg/bilj.) ukazuje da je soj 542 bio najaktivniji u pogledu azotofiksacije i da se značajno razlikovao od ostalih ispitivanih sojeva *B. japonicum* kao i od kontrole sa punom normom azota (5.75 mg/bilj.). Ostali sojevi *B. japonicum* (532, 525 i 526) i izolat "Knj" se međusobno nisu značajno razlikovali u pogledu sadržaja ukupnog azota kao i od kontrole- $N\emptyset$. Soj 2001 se svojim neefektivnošću značajno izdvajao od njih jer je u simbiozi sa zelenom vignonom ostvario najmanji prinos suve biljne mase (302 mg/ bilj.), ukupnog azota (2.63 mg/ bilj.) što je u skladu sa niskom vrednošću fiksiranog azota (1.17mg/bilj.).

Nodulisane biljke imale su tamno zelenu boju listova kao i kontrola- $N\emptyset$. Nodule formirane u simbiozi zelene vigne sa sojevima *B. japonicum* bile su tamno bež boje, izrazito krupne (0,5 cm) i pojedinačno raspoređene na korenskim dlakama u prvoj polovini korenovog sistema. U poređenju sa ovim sojevima, izolat "Knj" je formirao više nodula grozdastog oblika, srednje veličine i raspoređene po celom korenu. Soj 2001 je formirao po 1-2 sitne kvržice na korenskim dlakama druge polovine korena, što ukazuje na njihovu neefikasnost u prinosu biljaka koje su njime inokulisane. Kontrolne biljke koje su rasle bez azota i inokulacije ($\emptyset$) imale su svetlo zelene listove što se manifestovalo slabim prinosom i niskim sadržajem ukupnog azota.

Simbioznu efektivnost ili učinak azotofiksacije u pogledu prinosa predstavlja odnos suve biljne mase inokulisanih biljaka i kontrole sa punom normom azota- $(N\emptyset)$ i ukazuje na doprinos azotofiksacije kvantitetu prinosa u odnosu na prinos ostvaren korišćenjem mineralnog azota iz podloge. Ako prinos kontrolnih biljaka sa punom normom azota iznosi 100%, tada prinos inokulisanih biljaka sa *B. japonicum* i "Knj" ostvaren u procesu azotofiksacije iznosi 77-117% (Slika 1). Na isti način izkazane vrednosti ukupnog azota u biljnj masi su varirale 75-138%, odnosno u pogledu sadržaja fiksiranog azota 49-113%. Značajno je naglasiti da su u procesu azotofiksacije, inokulisane biljke sojevima 542, 532 i izolat "Knj" ostvarili bolji ili približno isti prinos kao biljke

koje su koristile punu normu mineralnog azota iz podloge, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Hoque, 1993; Mahboob and Asghar, 2002; Herridge et al., 2005).



Slika 1. Efektivnost simbiotičkih zajednica rizobia-*Vigna radiata* kao procentualna vrednost u odnosu na kontrolu sa punom normom azota (100%).

Figure 1. Efficiency of symbiotic community rhizobia-*Vigna radiata* as percentages value according to control with full N content (100%).

Virulentnost sojeva *B. japonicum* specifičnih za soju Kolekcije Instituta ispitana je na zelenoj vigni polazeći od činjenice da su rodovi *Glycine* i *Vigna* filogenetski u bliskom odnosu (Yokoyama et al., 2006) kao i da *B. japonicum* endosimbiont soje i zelene vigne (Gotteert et al., 1990). Ova činjenica objašnjava efikasnu azotofiksaciju ostvarenu inokulacijom zelene vigne sojevima *B. japonicum*. Efikasnost soja "Knj" se može objasniti njegovim poreklom iz rizosfere zelene vigne.

Rukovodeći se podacima da neki sojevi roda *Bradyrhizobium* mogu da formiraju nodule osim na soji i na vrstama roda *Vigna* (Jorda, 1984) u koje spada i *V. radiata* (Yokoyama et al., 2006), ispitivali smo nodulaciju ove vrste vigne inokulacijom sojem *Bradyrhizobium spp.* 2001 specifičnog za vignu i dobijenog iz Brazila. Međutim, ovaj soj je bio slabo virulentan što se ispoljilo kroz slabu nodulaciju i intenzitet azotofiksacije. Neefikasnost soja 2001 moguće je objasniti poreklom soja iz drugog geografskog područja što utiče na odsustvo kompatibilnosti među simbiotima (Tien et al., 2002; Yokoyama et al., 2006). Osim toga sojevi rizobia klasifikovani u vrstu *Bradyrhizobium spp.* predstavljaju heterogenu grupu koja pokazuje različitu simbiotičku aktivnost na cowpea cross-inokulacionoj grupi kojoj pripada zelena vigna (Thies et al., 1991; Yokoyama et al., 2006).

Potencijal u azotofiksaciji biljnog genotipa i sojeva rizobia predstavlja neophodnost efektivne simbiotičke zajednice u cilju dobijanja kvalitetne i ekološki zdrave hrane koja predstavlja cilj organske poljoprivrede. Značajna efikasnost soja 542 ali i ostalih sojeva *B. japonicum* kao i izolata "Knj" ukazuje da oni imaju značajan potencijal u azotofiksaciji i da postoji realna osnova za ispitivanja na drugim genotipovima zelene vigne jer je kompatibilnost simbiotima važan faktor koji utiče na intenzitet azotofiksacije.

Zaključak

Najaktivniji sojevi su bili sojevi *B. japonicum* od kojih se efikasnošću naročito izdvajao soj 542 koji sa sojem 532 i izolatom "Knj" predstavlja potencijalne agense mikrobiološkog N đubriva. Utvrđena efikasnost sojeva 525 i 526 ukazuje na potrebu za daljim ispitivanjima na drugim genotipovima *Vigna radiata*.

Zahvalnica

Ovo istraživanje je finansirano od strane Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije u okviru projekta BT 006875.

Literatura

- Drevon, J.J., Kalia, V.C., Heckmann, M.O., Salsac, L. (1987): Influences of the *Bradyrhizobium japonicum* hydrogenase on the growth of Glycine and Vigna species. *Applied and Environmental Microbiology*, 3, 610-612.
- Gottfert, M., Philipp, G., Hennecke, H. (1990): Proposed regulatory pathway encoded by the nodV and nodW genes, determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 2680-2684.
- Hafeez, F.Y., Aslam, Z., Malik, K.A. (1988): Effect of salinity and inoculation on growth, nitrogen fixation and nutrient uptake of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Plant and Soil*, 106, 3-8.
- Haq, K.S., Atif, S.M., Khan, R.H. (2005): Biochemical characterization, stability studies and N-terminal sequence of a bi-functional inhibitor from *Phaseolus aureus* Roxb. (Mung bean), *Biochimie*, 87, 1127-1136.
- Herridge, D.F., Robertson, M.J., Cocks, B., Peoples, M.B., Holland, J.F., Heuke, L. (2005): Low nodulation and nitrogen fixation of mungbean reduce biomass and grain yields. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 45, 269-277.
- Hoque, M.S. (1993): *Bradyrhizobium* technology: a promising substitute for chemical nitrogen fertilizer in Bangladesh agriculture. *Plant and Soil*, 155-56, 337-430.
- Islam, M.S. (1999): Comparative performance of commercial mungbean varieties under postrice and upland cropping systems. AVRDC Report 1999. Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhua, Tainan, Taiwan, 125-129.
- Myers, R. L. (2000): Mungbeans: A Food Legume Adapted to Hot, Dry Conditions, Alternative Crop Guide, Published by the Jefferson Institute. <http://www.jeffersoninstitute.org/pubs/mungbean.shtml>
- Mahboob, A., Asghar, M. (2002): Effect of seed inoculation and different nitrogen levels on the grain yield of mungbean. *Asian Journal of Plant Sciences*, 1, 314-315.
- Pochon, J. (1954): Manuel technique D'Analyse Microbiologique du soil. Masson et Cie, Editeurs.
- Rahman, M.A., Islam, A., Islam, N., Hassan, M.K., Talukder, M.M.R. (2002): Yield performance of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczk) cv. Barmung-4 as influenced by Rhizobium inoculation and NPK fertilizers. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5, 146-148.
- Oplinger, E.S., Hardman, L.L., Kaminski, A.R., Combs, S.M., Doll, J.D. (1990): Mungbean, Report Alternative Field Crops Manual, Minnesota Extension Service, University of Wisconsin-Extension, University of Minnesota Center for Alternative Plant and Animal Products, May, 1-4.
- Tien, H.H., Hien, T.M., Son, M.T., Herridge, D. (2002): Rhizobial inoculation and N₂ fixation of soybean and mungbean in the eastern region of South Vietnam. In: Herridge, D. (ed.), *Inoculants and Nitrogen Fixation of Legumes in Vietnam*, 109e Proceedings, ACIAR, 29-36.

- Vincent, M.J. 1970. A Manual for the Practical Study of the Root Nodule Bacteria. IB Hand-book no. 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Vlassak, K.M., Vanderleyden, J. (1997): Factors influencing nodule occupancy by inoculant rhizobia. Crit. Rev. Plant Sci., 16, 163-223.
- Vojnović, Ž., Miličić, B., Radin, D., Kuzmanović, Đ. (1989): Prisustvo i aktivnost sojeva *Rh. meliloti* and *Rh. trifolii* u nekim zemljištima Srbije. Mikrobiologija, 28, 69-81.
- Yokoyama, T., Tomooka, N., Okabayashi, M., Kaga, A., Boonkerd, N., Vaughan, D. (2006): Variation in the nod gene RFLPs, nucleotide sequences of 16S rRNA genes, Nod factors, and nodulation abilities of *Bradyrhizobium* strains isolated from Thai Vigna plants. Can. J. Microbiol., 52, 31-46.
- Zerhari K; Aurang J., Khbaya B., Kharchaf D., Filali-Maltouf A. (2000): Phenotypic characteristics of rhizobia isolates nodulating acacia species in the arid and Saharan regions of Morocco. Letters in Applied Microbiology, 30, 351-357.

STRAIN INFLUENCE OF PARTICULAR RHIZOBIAL SPECIES TO NITROGEN FIXATION ABILITY OF MUNGBEAN, *VIGNA RADIATA* (L.) WILCZEK

Dušica Delić, Olivera Stajković, Nataša Rasulić, Đorđe Kuzmanović,
Radmila Pivić, Dragana Jošić, Bogić Miličić

Institute for Soil Science, Belgrade.

Summary: In pot experiment, 4 strains of *Bradyrhizobium japonicum*, 1 strain of *Bradyrhizobium* spp, 4 strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and 1 autochthonal isolate from field (location named Krnješevci), were examined for effect on mung bean, *Vigna radiata*, effectiveness in symbiotic N₂ fixation in order to applying them as inoculant in microbiological N fertilizer.

Strains of *B. japonicum* and "Knj" isolate were found to produce root nodules in mung bean. Grouping and position of nodules were depended of efficient BNF: effective, single of *B. japonicum* nodules were arranged in the first part of root system and in form of cluster of "Knj" isolate. Strain 2001 of *Bradyrhizobium* spp. formed a small number of nodules which was indicated ineffective symbiosis. Strains of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* did not nodulate mung bean. Based on shoot dry weight and total N content, the strains of *B. japonicum* and "Knj" isolate were more effective for BNF than *B. spp.* Strains of *B. japonicum* and "Knj" isolate showed high potential of N₂ fixation, particularly strain *B. japonicum* 542 strains and "Knj" isolate, realized 77-117% shoot dry weight, 75-138% total and 49-113% fixed N content of uninoculated control with full N content (100%). No significant difference was found between the plants inoculated with *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* strains, 2001 strain of *Bradyrhizobium* spp. and uninoculated control plants without N which indicates symbiotic N₂ fixation inactivity of them.

Presented data show that *B. japonicum* 542 strains and "Knj" isolate can be used in further investigations in order to applying them as inoculants in microbiological N fertilizers.

Key words: *Vigna radiata*, rhizobial species, modulation, symbiotic -effectiveness