Wpływ próchnicy rozpuszczalnej na infekcję grochu przez bakterie brodawkowe

The influence of soluble humus substances on infection of pea-plants by the root-nodule bacteria

Napisała

Halina Brodowska-Dworakowska

(Wpłynęło do redakcji 27 grudnia 1938 — Received for publication December 27, 1938)

(Z 5 rycinami w tekście — with 5 figures in the text)

WSTĘP

Praca niniejsza miała na celu zbadanie, o ile rozpuszczalna w wodzie próchnica wywiera wpływ na przebieg infekcji bakteriami brodawkowymi u grochu. We wstępie omówię krótko literaturę dotyczącą najważniejszych czynników, które określają przebieg infekcji i jej nasilenie, a nieco szczegółowiej omówię te prace, które dotyczą związków próchnicznych.

W sposób decydujący wpływa na przebieg zakażenia ilość azotu przyswajalnego dla rośliny w środowisku. Szereg autorów od dawna zajmowało się tym zagadnieniem (1). Roztwór zawierający 1% *N* wiążanego hamuje zupełnie wiązanie wolnego azotu na drodze życia symbiotycznego (2), 0.01—0.1% *N* już nie sprzyja temu zjawisku (3). Według A. Démolona azotany działają także ujemnie na plon szcze-

(1) Nobbe u. Richter, Wohltmann, Kaserer, Löhnis, Niklas u. Poschenrieder, Iwasaki, Rippel, H. i E. Pringsheim.

(2) Michustin E. u. Bernard W.: Zur Frage über die Bindung des Luftstickstoffs durch Leguminosen; wg Zentralbl. f. Bakteriologie II, 95, 1936—37, 354.

(3) Strowd W. H.: The relation of nitrates to nodule production. — Soil Science, X, 1920; wg Zentralbl. f. Bakteriologie II, 56, 1922, 143.

pionych roślin, a nawożenie azotanowe ma dawać plon niższy niż korzystanie z symbiozy (4).

Czynnikiem równie ważnym, jak poprzedni, lecz działającym w kierunku przeciwnym, — to dostatek węglowodanów w roślinie. Dostateczny dopływ węglowodanów do korzeni w początkach głodu azotowego, który decyduje o chwili wytworzenia brodawek w zakażonych roślinach, decyduje równocześnie o nasileniu infekcji. Zespół brodawek korzeniowych pobiera 3—6% asymilatów (5).

Metabolizm węglowodanów zależy przede wszystkim od ilości dostarczonego równocześnie azotu (6), dostatek ich — od światła oraz intensywności asymilacji, uwarunkowanej czynnikami genetycznymi i higienicznymi (7). Same brodawki przez regulację dostarczania dawek mineralnego azotu mogą podsycać intensywność fotosyntezy (8).

Na przebieg infekcji korzeni wpływa odczyn środowiska. Optimum wynosi dla organizmów z grochu około pH 6·5 (9), według Ziemieckiej 6·3—7·5, według Śnieszki 5·5—6·3 (10). Temperatura ma również znaczenie, jakkolwiek granice są szersze: optimum, zdaje się już przy 24° (11). Pod względem ciśnienia cząsteczkowego tlenu bakterie korzonkowe mają wymagania nieznaczne, a wpływ tego

-
- (4) Démolon A. et Dunez A.: Observations agronomiques sur la symbiose bactérienne des légumineuses; wg *Uprawa Roślin i Nawożenie VIII*, zesz. 3, 1938, 220.
- (5) Allison F. E.: Carbohydrate supply as a primary factor in legume symbiosis. — *Soil Science* 39, 1935, 123—43.
- (6) Orcutt F. S. and Wilson P. W.: The effect of nitrate-nitrogen on the carbohydrate metabolism of inoculated Soybeans. — *Soil Science* 39, 1935, 289—96.
- (7) Raju M. S.: Variations in the infective power of the nodule bacteria of Cowpea group. Influence of light on infection. — *Zentr. f. Bakt.* II, 94, 1936, 337.
- Kostytschew S.: Studien über Photosynthese IV. Die CO₂-Assimilation der Leguminosen. *Ber. d. d. Bot. Ges.* 40, 1922, 112—20.
- (8) Rippel A. u. Krause W.: Lassen sich Beziehungen zwischen Kohlenhydratbildung und Knöllchen bei Leguminosen feststellen? — *Arch. f. Mikrob.* 5, 1934, 14; wg *Zentr. f. Bakt.* II, 90, 380.
- (9) Laboratorium: Biokemialinen Tutkumuslaitos, Helsinki.
- (10) Śnieszko S.: L'influence exercée par la concentration des ions d'hydrogène du milieu nutritif sur le développement des bactéries des nodosités du Haricot, du Trèfle rouge, du Pois cultivé et de la Vesce. — *Bull. de l'Acad. Pol. Sér. B*, 1928, 55.
- (11) Jones F. R. a. Tisdale W. B.: Effect of soil temperature upon the development of nodules on the roots of certain legumes. — *Journ. Agr. Res.* 22, 1921, 17; wg *Zentr. f. Bakt.* II, 58, 1923, 343.

czynnika w warunkach normalnych zdaje się być ograniczony (12). Dużą wagę przypisuje się wilgoci (13), jakkolwiek wpływ ten nie został dotąd, zdaje się, ściślej ujęty. Zarówno wilgoć, jak i tlen ważne są ze względu na zdrowie rośliny gospodarza, ten sam wpływ wywiera nawożenie (14). Zajmowano się głównie sprawą nawożenia wapnem oraz potasem (15). Ponadto zwraca się uwagę na dostatek

- (12) Georgi C. E. a. Wilson P. W.: The influence of the tension of oxygen on the respiration of *Rhizobia*. — Arch. f. Mikrob. 4, 1933, 543.
 Konishi K. a. Fukuchi F.: On the respiration of nodule bacteria. — Journal of the Sc. of Soil and Manure Japan 8, 1934, 297; wg Zentr. f. Bakt. 93, 1935—6, 304.
 Walker R. H., Anderson D. A. a. Brown P. E.: Physiological studies on *Rhizobium* I. The effect of nitrogen source on oxygen consumption by *Rhizobium leguminosarum* Frank. — Soil Sc. 37, 1934, 387.
- (13) Krüger: Die Ackerbewässerungsversuche des Jahres 1908.
- (14) Wohltmann: Die Knöllchenbakterien in ihrer Abhängigkeit von Boden ü. Düngung. — Journ. f. Landw. 50, 1902, H. 4; wg Zentr. f. Bakt. II, 10, 1903, 387.
 Herke A.: Impfversuche mit Knöllchenbakterien an Lupinen und Sera-della. — Kiserl. Közlemények XVI, 1913, 10; wg Zentr. f. Bakt. II, 39, 1913/14, 156.
 Gerlach u. Vogel: Versuche über d. Impfung von Leguminosen mit Knöllchenbakterien. — Mitteil. d. Kais. Wilh. Institut. f. Landw. Bromberg I, 1908, 123; wg Zentr. f. Bakt. 22, 1909, 416.
 Okada: Contribution on the knowledge of the soils mikroflora of *Pseudo-sasa* association III. Inoculative test with *Rhizobia*. — Sc. Rep. Tohoku Imp. Univ. 4. Ser. Vol. 11, 1936, 253; wg Zentr. f. Bakt. II, 96, 1937, 356.
 Take, Immendorf, Hessenland, Schütte u. Minssen: Über das Verhalten der Bakterien der Leguminosen-Knöllchen gegen Ätzkalk. — Mitt. d. Ver. Förd. d. Moorkultur i. d. deutsch. Reich, 13, 1895, 389, wg Zentr. f. Bakt. II, 2, 1896, 161.
 Störmer: Ein Versuch zur weiteren Verbesserung d. Reinkulturimpfverfahrens f. Leguminosen. — Mitt. d. landw. Inst. d. Un. Leipzig 1907, H. 8, 115; wg Zentr. f. Bakt. II, 22, 1909, 141.
 Heinze B.: Der günstige Einfluss einer vermehrten Kalkzufuhr auf die Ernährung der gesamten niederen und höheren Lebewesen. — Fühlings Landw. Ztg. 1916, 463; wg Zentr. f. Bakt. II, 50, 1920, 186.
 Pitz W.: Effect of elemental sulphur and of calcium sulphate on certain of the higher and lower forms of plant life. — Journ. Agric. Res. V, 1916, 775; wg Zentr. f. Bakt. II. 50, 1920, 264.
- (15) Seelhorst-Voigt: Kali-Düngungsversuche.
 Laurent: Observations sur le développement des nodosités radicales chez les légumineuses.
 Korczewski M. i Majewski F.: Wpływ pokarmów potasowych na rośliny motylkowe. — Roczn. N. R. i L. 44, 1938, 55.
 Górski M., Krotowiczówna J. i Salcewicz J.: Działanie różnych nawozów potasowych pod rośliny motylkowe. — Roczn. N. R. i L. 44, 1938, 125.

magnezu (1%), nieobojętnym ma być również mangan (16). Badano również wpływ niektórych koloidów, agaru, ekstraktów z roślin oraz próchnicy. Ciekawym ze względu na temat mojej pracy jest to, co Hiltner (17) w r. 1913 zaobserwował w kulturach wegetacyjnych grochu. Otóż tworzenie brodawek korzeniowych było w tych doświadczeniach w znacznym stopniu zależne od rodzaju pożywki. I tak woda deszczowa miała ogromną przewagę nad destylowaną, w której rozwój roślin był znacznie słabszy. Dla seradeli najlepsze rezultaty osiągnięto przy użyciu pożywek z dodatkiem kwasu krzemowo-humusowego. Nawożenie próchnicą dobrze działało także na zwalczanie raka koniczynowego. Czystej próchnicy przypisuje autor własności sprzyjające infekcji a własności te próbuje wytłumaczyć „lepszą jonizacją“ pożywek. Jest to więc zagadnienie bliskie tematowi niniejszego sprawozdania.

Inne badania, dotyczące próchnicy odnoszą się do czystych kultur bakterii brodawkowych. Otóż według Allisona (18) organizm ten charakteryzuje potrzeba specyficznego czynnika wzrostu, nazwanego koenzymem, który występuje w melasie z trzciny cukrowej, drożdżach, kwasach próchnicznych i albuminie białka. Poza tym znany jest fakt, że świetnie na rozwój kultur działa wyciąg z tej rośliny, z którą dany organizm współżyje, lub z innej. Jaka jest ich właściwa rola, nie wiadomo. Nie stwierdzono też, czy substancja, potrzebna do rozwoju znajduje się w liściach, czy innych częściach rośliny (19). Pobieranie tlenu jest u *Rhizobium meliloti* proporcjonalne do stężenia ekstraktu z drożdży (20). Poza tym Virtanen zauważył stymulujący wpływ wyciągu z *Aspergillus niger* (21).

(16) Olaru D.: Action favorable du manganèse sur la bactérie des légumineuse. — C. R. Ac. Paris 160, 1915, 280.

(17) Hiltner: Untersuchungen über die Ernährungsverhältnisse unserer Kulturpflanzen. — Landw. Jahrb. f. Bayern 10, 1913, 99; wg Zentr. f. Bakt. II, 43, 1915, 512.

(18) Allison E. F. a. Hoover S. R.: An accessory factor for legume nodule bacteria. Sources and activity. — Journ. of Bact. 27, 1934, 56, wg Zentr. f. Bakt. II, 91, 1934/35, 422.

(19) Lewis K. H. a. McCoy E.: Root nodule formation of the Garden-Bean, studied by a technique of tissue culture. Bot. Gaz. 95, 1933, 316; wg Zentr. f. Bakt. II, 92, 1935, 198.

(20) Walker R. H., Anderson D. A. a. Brown P. E.: The comparative growth rates of *Rhizobium meliloti* and *Rh. Japonicum*. — Zentr. f. Bakt. II, 86, 1932, 433, i 87, 1932/33, 27.

(21) Virtanen A. I., Nordlund M. a. Hollo: Fermentation of sugar by the root nodule bacteria. — Biochem. Journ. 28, 1934, 796, wg Zentr. f. Bakt. II, 92, 1935, 469.

Oprócz tego pojawiały się notatki o stymulującym działaniu agaru na pewne mikroorganizmy (22).

Oprócz wszystkich czynników zewnętrznych, które należało wziąć pod uwagę przy badaniu jednego z nich, równie ważne jest zachowanie się czynnika wewnętrznego, zatem sprawa wirulencji i poszczególnych pni bakteryjnych oraz podatności genetycznej i indywidualnej roślin. Bardzo bogatą lekturę z tej dziedziny pomijam, ze względów technicznych.

Zadanie moje zostało podzielone zatem na dwa podrzędne: 1) zbadanie, czy próchnica rozpuszczalna jest rzeczywiście czynnikiem wzrostu dla czystych kultur bakteryjnych z brodawek grochu oraz 2) czy istnieje stymulujący wpływ roztworów próchnicznych na przebieg samej infekcji i czy polega on na osłabieniu odporności rośliny. Przeprowadzałam zatem trzy typy doświadczeń: 1) nad wzrostem czystych kultur bakteryjnych; 2) wegetacyjne, w których działaniu próchnicy poddane były stale i rośliny i zakażające bakterie; 3) wegetacyjne, w których tylko rośliny mogły ulec działaniu związków próchnicznych.

Opis metody

Czyste kultury hodowałam na pożywce, w różny sposób modyfikowanej, o pierwotnym składzie następującym:

- 80 cm³ wody wodociągowej
- 20 cm³ wyciągu z grochu,
- 0.1 g asparaginy,
- 0.5 g glukozy,
- 13 g żelatyny lub 1.8 g czystego agaru.

Wyciąg z grochu przygotowałam w następujący sposób: 100 g świeżej masy zalałam 400 cm³ wody destylowanej, następnie gotowałam przez pół godziny na łaźni wodnej. Wyciąg przesączony, uzupełniony do 400 cm³ wodą destylowaną, sterylizowałam przez 20 minut przy jednej atmosferze ciśnienia w autoklawie.

W doświadczeniach tych eliminowałam wyciąg z grochu, zastępując go wodą wodociągową lub czystymi kwasami próchnicznymi rozpuszczalnymi w wodzie, zbliżonymi do fulw kwasów Sven Odena, otrzymywanymi w następujący sposób: torf niski przesuszony do zawartości 30—35% wody oddzielono na drodze

(22) Virtanen A. I.: Bemerkungen zu der Arbeit von A. Rippel: Über die Wirkung von geringen Mengen von Agar ect. — Arch. f. Mikrob. 7, 1936, 488; wg Zentralbl. f. Bakt. II, 96, 1937, 77.

Rippel A.: Über die Wirkung von geringen Mengen von Agar auf Wachstum und Stickstoffbindung von *Azotobacter* und auf andere microbiologische Vorgänge. — Arch. f. Mikrob. 7, 1936, 210; wg Zentr. f. Bakt. II, 95, 1935/36, 420.

sedymantacji od części ziemistych. Zebraną czarną masę organiczną zalewano w dużej zlewce kilkakrotnie 1% kwasem solnym celem usunięcia wapna, żelaza i innych składników. Po dokładnym wymyciu kwasu solnego płyn nad osadem przybierał zabarwienie czerwone. Po odrzuceniu dwu pierwszych frakcji zabarwionych, następnie zbierano do naczyń jenajskich do chwili, kiedy płyn zaczął barwić się na żółto. Wszystkie frakcje zebrano w naczyniu dużych rozmiarów celem wymieszania i osiągnięcia jednolitego roztworu, który posiadał zabarwienie czerwone. Poddano go następnie długotrwałej dializie. W 100 cm³ roztworu oznaczono około 19 mg czystych kwasów próchnicznych (23).

Pożywkę po sporządzeniu rozpuszczałam przy podwyższonej temperaturze, rozlewałam po 5—7 cm³ do zwykłych probówek i sterylizowałam w autoklawie. Izolacji dokonywałam z brodawek, wysterylizowanych w specjalnym aparacie,

Ryc. 1. Aparat do mycia ziarn. — Apparatus for washing grains.

złożonym z dwu kolb, przedstawionym na rycinie 1. Przemyciałam 3 minuty sublimatem 0.1%, 2 minuty alkoholem 96%, i trzy razy wodą sterylizowaną wmyślałam sublimat i alkohol. Następnie w szalce Petri'ego rozgniatałam sterylizowanym przecikiem szklanym brodawki i szczepiłam do płynnych pożywek agarowych i żelatynowych w temperaturze około 37° C, używając przecika platynowego. Po skośnym zastygnięciu pożywek w probówkach wstawiałam je do termostatu, utrzymując temperaturę 22—23° C. Wszystkich przeszczepień dokonywałam w sposób podobny, posługując się jedynie palnikiem.

Na pożywkach żelatynowych wzrost kultur był powolny, na agarze wy-

(23) B. Niklewski i J. Wojciechowski: Wpływ związków próchnicznych na rozwój roślin. — Acta Soc. Bot. Pol. XV, p. 61.

rażne kolonie w postaci białawych smug i kropli pojawiały się 4 lub 5 dnia. Kontrolowałam rozwój kultur pod mikroskopem barwiąc fioletem genejanowym.

Celem jak najdalej idącego uproszczenia warunków i wyeliminowania czynników pobocznych używałam w części doświadczeń wegetacyjnych metody kultur wodnych, prowadzonych w warunkach aseptycznych. Metoda ta była dokładnie wzorowana na będącej w użyciu przez współpracowników instytutu Biokemiallinen Tutukimuslaitos w Helsinkach. Miałam możność zapoznania się z nią dzięki uprzejmemu pozwoleniu prof. Artturi Virtanena, kierownika wspomnianego Zakładu. Jest ona opisana w szeregu wydawnictw tamtejszej pracowni, opiszę ją zatem krótko ze względu na możliwość zmian, jakie bezwiednie mogłam w niej poczynić.

Rośliny, przeznaczone do doświadczeń, musiały być od początku wyhodowane z zachowaniem zasad aseptyki. W tym celu odliczoną ilość najładniejszych ziarn grochu umieszczałam w jednej z dwu połączonych i wysterylizowanych kolbek, przedstawionych na rycinie 1. Następnie przemywałam ziarna alkoholem, wytrząsając je ustawicznie przez przeciąg dwóch minut, a po zlanii alkoholu przez boczny otwór kolbki, zamknięty gumką i ściśkaczem, przez cztery minuty przemywałam sublimatem. Następnie odlewałam sublimat i wymywałam sterylizowaną wodą z kolbki nr 2 trzykrotnie, zawsze odlewając wodę, po czym zwilżałam niezbyt silnie ziarna i zostawiałam do specznienia na okres 6 godzin, w zamkniętym termostacie przy temperaturze około 28° C. Po upływie potrzebnego czasu przekładałam speczniałe ziarna wyżarzoną w płomieniu pincetą z zachowaniem zwykłych ostrożności do poprzednio przygotowanych probówek o średnicy 2·5 cm i długości 20 cm. W probówkach znajdowała się galaretka agarowa z pożywką o następującym składzie:

100 cm³ wody destylowanej,
po 0·025 g KCl, Ca₃(PO₄)₂, CaSO₄,
0·0394 g MgSO₄,
1·5 g agaru,
kropla 5% FeCl₃.

Pożywka ta po rozpuszczeniu rozlewana była po 5 cm³ do probówek i sterylizowana w autoklawie przez 30 minut przy 1 atmosferze, po zamknięciu probówek zwykłymi korkami z waty. Do tak przygotowanych probówek dostały się speczniałe ziarna grochu, pojedynczo do każdej probówki, po czym kiełkowały i rosły, początkowo w miejscu zacienionym i ciepłym (około 20° C), później na świetle w szklarni, gdzie stały wszystkie kultury wegetacyjne. Po upływie około 10 dni roślinki dorastały do korka i wówczas używałam ich do założenia aseptycznych kultur grochu w specjalnie do tego celu przygotowanych dwu połączonych kolbkach, z których jedna kolbka próżniowa, połączona była gumką z rurką szklaną, przechodzącą przez gumowy, ściśle dopasowany korek drugiej kolby (ryciny 2 i 3). Kolba pierwsza po wypełnieniu pożywką do wysokości tubusu zamknięta była watą, kolba druga zawierała zapas pożywki dla rośliny, wegetującej w kolbie pierwszej, a korek z niej był zaopatrzony w drugą jeszcze cienką i zagiętą rurkę. Rurka ta również zamknięta była watą. Tak przygotowane kolby sterylizowałam w autoklawie. Po całkowitym ostygnięciu były one używane do zaszczepienia w nich grochu, wyhodowanego w probówkach.

Skład bezazotowej pożywki wg Hiltnera używanej do doświadczeń wegetacyjnych był następujący:

Ryc. 2. Groch hodowany aseptycznie 1.
Pea-plant grown up in an aseptic culture.

Ryc. 3. Groch hodowany aseptycznie 2. — Pea-plant grown up in an aseptic culture.

10 litrów wody destylowanej,

2·5 g KCl,

2·5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$,

2·5 g CaSO_4 ,

3·94 g MgSO_4 ,

30 kropeł 5% roztworu FeCl_3 .

Pożywki tej dawałam 1·5 litra na komplet kolb i dodawałam do wszystkich kompletów równą (np. 910 cm³) ilość wody wodociągowej dla uzupełnienia braków, spowodowanych transpiracją. Stężenie zatem w kolbie vegetacyjnej nie było stałe, a mogło ulegać pewnym wahaniom, jeśli transpiracja była wyjątkowo silna. Wszystkie kolby stały w możliwie identycznych warunkach.

Przesadzania grochu do kolb dokonywałam w specjalnej szafce szklanej, w której przy pomocy wypełnienia dwukrotnego parą wodną uzyskano oczyszczenie zawartego w niej powietrza. Probówki lekko ogrzewałam płomieniem, po czym przez wstrząśnięcie uzyskiwałam odklejenie agaru z korzeniami od ścianki i ostrożnie wyżarzona w płomieniu i ostudzoną pincetą wyjmowałam roślinki z probówek, szybko umieszczając je po dwie w otworze kolby vegetacyjnej, którą zamykałam owiniętą wokół łożyczek watą. Groch rósł w pożywce, ponad którą

zawsze pozostawiała część korzeni otoczona powietrzem, i tu najsilniej tworzyły się brodawki. Ze względu zarówno na zdrowie rośliny, jak i dlatego, by zanulować niekorzystny dla asymilacji azotu fakt zalania przestworów powietrznych strefy bakteroidalnej (24), stosowałam wietrzenie (25) w ilości około 4·5 litra powietrza na kolbę dziennie. Wietrzenia dokonywałam poprzez umieszczoną w korku z waty równocześnie z roślinami wysterylizowaną rurkę szklaną, zamkniętą watą. Powietrze ponadto filtrowałam przez szeroką szklaną rurkę zaopatrzoną w kran i wypełnioną tak samo watą. Kolby owijałam papierem, którego czarna strona zwrócona była wewnątrz, aby uniknąć przegrzania pożywki w gorące i słoneczne dni. Objętość kolby wegetacyjnej wynosiła 1200 cm³.

W niektórych doświadczeniach aseptyczność nie była już całkowicie zachowana. Sadziłam groch, wyhodowany, jak poprzednio, bez użycia szafki, posługując się jedynie palnikiem. Poza tym uzupełniałam wyparowaną wodę zwalniając ścisak z prowizorycznie dołączonej kolby, i to wodą sterylizowaną lub zwykłą wodociagową. Zatem w miarę wzrostu roślin coraz mniej zachowana była aseptyczność kolb. Tubus boczny zamknięty był rurką gumową i ścisakczem. Okazało się, że zakażenie bakteriami korzonkowymi z otoczenia w tych warunkach nie następowało.

W doświadczeniach, w których zmieniałam w czasie wzrostu pożywkę, dokonywałam tego w prosty sposób, zlewając ją przez tubus, wymywając kilkakrotnie wodą i nalewając nową pożywkę przy pomocy kolby. Uważałam, by wata w kolbie nie uległa przy tych czynnościach zamoczeniu.

Równocześnie z zasadzaniem roślinek do kolb dokonywałam szczepienia precikiem platynowym z czystej kultury do agaru, który pozostawał na korzeniach lub też strącałam go na dno kolby. Nie było różnicy między tym lub innym postępowaniem.

Oprócz kultur wodnych w kolbach aseptycznych i półaseptycznych używałam kultur wodnych w zlewkach i słojach, które zakładałam w ten sposób, że skielkowany w piasku, wymyty groch o długości korzenia około 3—5 cm przekładałam na kążki drewniane, wygotowane i pokryte z obu stron bibułą wysyconą parafiną. Wielkość kążków była tak dobrana, by brzegi bibuły można było przyklejać do brzegów słoja. Słoje napełniałam do pewnej wysokości bezazotową pożywką, stale używaną, i jedynie rośliny z kążkami przekładałam na pewien okres czasu do innych roztworów. W takim razie szczepienia roślin w słojach, a także w kolbach dokonywałam przez rozpylanie na korzenie określonej ilości wody, wyklóconej z czystą kulturą. O ile niekiedy szczepiłam z brodawki, rozgniatałam ją w wodzie i dalej postępowalam jak poprzednio. Słoje przewietrzałam co dzień w zwykły sposób.

W doświadczeniu ostatnim użyłam zwykłych kultur doniczkowych. Do podlewania ich używałam pożywki o następującym składzie:

1 litr wody destylowanej, 1·125 g KCl, 1·05 g KH₂PO₄, 1·0 g CaSO₄, 0·9 g MgSO₄. Rozcieńczałam w stosunku 1:15 wodą wodociagową i podlewałam na wadze, dając wszystkim doniczkom tę samą ilość pożywki, resztę straty na wadze uzupełniałam wodą wodociagową.

(24) Nobbe u. Hiltner: Über die Wirkung der Leguminoseknöllchenbakterien in der Wasserkultur. — Landw. Versuchst. 52, 1899, 455.

(25) Virtanen A. I. a. van Hausen S.: Continued investigations on the effect of air content of the medium on the development and function of the nodule. — Journ. Agric. Sc. 26, 1936, 281; wg Uprawa Roślin i Nawożenie VIII, z. III, 1938, 221.

Humian potasowy, użyty do doświadczeń, otrzymano jak następuje: preparat próchniczny, otrzymany przez ekstrakcję torfu niskiego przy pomocy roztworu węglanu potasowego, odsączono i wysuszono przy temperaturze niższej od 70° C. Skład jego przedstawiał się jak następuje:

rozpuszczalnej próchnicy	27·00%
K ₂ O	13·73%
Fe ₂ O ₃	1·60%
P ₂ O ₅	0·13%
N	0·86%

Duża jest zawartość azotu, stwierdzono jednak, że jest on w postaci nieprzyswajalnej dla roślin.

Roztwór kwasów próchnicznych rozpuszczalnych w wodzie przygotowany był tak samo, jak do doświadczenia nad wzrostem kultur. Dializy nie stosowano. Zawierał on w 100 cm³ roztworu 21·2 mg masy próchnicznej. Popiołu ani azotu roztwór ten nie zawierał.

Doświadczenia nad wzrostem czystych kultur *Bacillus radicola* Beij. Experiments on the subject of growth of pure cultures of *Bac. rad.* Beij.

Modyfikując w różny sposób podany powyżej skład pożywki dla czystych kultur bakteryjnych starałam się zbadać, czy próchnica wpływa na szybkość wzrostu kultur oraz czy podobnie działa agar. Metoda nie była opracowana ilościowo i ograniczała się do obserwacji makro- i mikroskopowej, z tego też powodu wyniki są jedynie orientacyjną wskazówką. Przy wielokrotnym przeszczepieniu na szereg pożywek stwierdziłam co następuje:

1) W pożywkach agarowych rozwój następuje proporcjonalnie do stężenia agaru i jest możliwy już przy 0·1%.

2) Wyciąg z liści grochu nie jest koniecznym warunkiem dobrego wzrostu, lecz wpływa korzystnie przy użyciu go w ilości 20% wyciągu w pożywce.

3) Wyciąg z liści grochu daje się z łatwością zastąpić roztworem kwasów próchnicznych w ilości około 40%, tj. około 8 mg czystych kwasów w 100 cm³ pożywki.

4) Specyficzne substancje, zawarte w wodzie wodociągowej, można również zastąpić kwasami próchnicznymi.

5) Agar, woda z wodociągu, wyciąg z grochu i roztwór kwasów próchnicznych, przyrządzonych w sposób wyżej podany, zawierają składniki wystarczające do szybkiego wzrostu kultur na pożywce z glukozy i asparaginy — brak jednak doświadczeń z użyciem kwasów próchnicznych bez dodatku agaru.

Obserwacje powyższe pozwalają wnioskować, że kwasy próchniczne zastępują specyficzną zdolność pobudzania wzrostu bakterii brodawkowych w czystych kulturach, jaką posiada wyciąg z grochu.

Opis doświadczeń wegetacyjnych

Description of plant-culture experiments

Doświadczenie I — Experiment I

Wpływ dodatku próchnicy rozpuszczalnej oraz $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ na występowanie brodawek korzeniowych grochu w kulturach aseptycznych, szczepionych czystą kulturą
Soluble humus substances influencing the appearance of root nodules on pea-plants in aseptical cultures, inoculated with pure culture

Spostrzeżenie, że ilościowe pojawienie się brodawek na korzeniach grochu jest zależne od obecności w płynnej pożywce próchnicy, zaobserwowali w Zakładzie Fizjologii Roślin i Chemii Rolnej Uniwersytetu Poznańskiego p. Z. Tomaszewski i Z. Wojackówna w r. 1936. Dotyczyło ono gatunków: *Pisum sativum*, *Robinia pseudacacia*, *Trifolium incarnatum* (26). Doświadczenie moje miało potwierdzić tę obserwację i ująć w pewne cyfry. Jeśli chodzi o dawki saletry wapniowej (27), to spotykałam w literaturze twierdzenie, że nieznaczne dawki mineralnego azotu niwelując wpływ okresu głodowania działają korzystnie na przebieg infekcji bakteriami korzonkowymi oraz na rozwój rośliny (28). Ciekawym było zestawienie tych wpływów w warunkach aseptycznych. Groch wysiałam 13 V 1937, przesadziłam do kolb i zaszczepiłam 31 V 1937, zlikwidowałam 22 VI. Długość okresu wegetacyjnego wynosiła 40 dni. Dnia 16 po zasiewie, a 8 po zaszczepieniu wystąpiły brodawki korzeniowe, od razu w różnym nasileniu. Doświadczenie trwało 22 dni. Kultury prowadzone były całkowicie aseptycznie, według metody opisanej wyżej. Wyniki w tabeli I. Infekcja przebiegała w ogólności bardzo słabo, przy użyciu saletry wapniowej o stężeniu 0.1% około pięć razy lepiej niż w czystej pożywce, przy użyciu humianu potasowego o stężeniu 0.2% przeszło dziesięć razy lepiej. Przy równoczesnym wprowadzeniu azotanu i próchnicy mamy taki wynik jak przy dawce samego azotanu. Osobniki indywidualnie odporne znalazły się w ilości około 25%, można by przy tym sądzić, że zdrowie rośliny sprzyja infekcji, co da się wytłumaczyć dostatkim węglo-

(26) Niklewski B. u. Wojciechowski J.: Über den Einfluss der wasserlöslichen Humusstoffe auf die Entwicklung einiger Kulturpflanzen. Boden- u. Pflanzenernähr. Bd. 4 (49), 1937, 294.

Obs. Tomaszewskiego Z. i Wojackówny.

(27) Giöbel C.: The relation of the soil nitrogen to nodule development and fixation of nitrogen by certain legumes. — New Jersey Agr. Exp. Stat. Bull. 436, 1926, 125; wg Zentrbl. f. Bakt. II, 72, 1927, 467.

(28) Ramm: Zur Frage der Impfung bei Neukulturen auf Hochmoor. — Illustr. landw. Ztg. 1913, nr 66; wg Zentrbl. f. Bakt. II, 41, 1914, 285.

TABELA (TABLE) I

Wpływ próchnicy rozpuszczalnej i azotanu wapniowego na występowanie brodawek korzonkowych grochu (kultury aseptyczne szczepione czystą kulturą)
 Effect of soluble humus substances and of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ on the appearance of root nodules on pea-plants (aseptical cultures inoculated with pure culture)

Kultury Cultures	pH		Ilość brodawek Number of nodules	Waga brodawek Weight of nodules in <i>mg</i>
	22 V	22 VI		
A Nieszczepione Non-inoculated	7·0 7·0	7·0 7·0	—	—
B Szczepione Inoculated	6·5 6·5	7·0 7·0	6	0·0030
C Szczepione z dodatkiem Inoculated with add. of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0·1%	7·0	7·0	36	0·0180
	7·0	7·0	25	0·0150
D Szczepione z dodatkiem $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0·1% + humian potasu Inoculated with add. of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0·1% + hum. potas.	7·0	7·0	67	0·0341
	7·0	7·0		
E Szczepione z dodatkiem $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0·1% + hum. pot. 0·2% Inoculated with add. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ + hum. potas. 0·2%	7·5	7·2	30	0·0180
	7·5	7·2		roślina uszkodzona

wodanów. Oba czynniki okazały się jako działające dodatnio na infekcję w wyżej opisanych warunkach, jednak 0·2% preparatu torfowego zawierającego 0·86% azotu w formie nieprzyswajalnej działa dwa razy silniej niż 0·1% saletry wapniowej.

Doświadczenie II — Experiment II

Wpływ zanurzenia roślin, hodowanych w pożywce bezazotowej, w roztworach próchnicy przez 48 godzin przed szczepieniem
 Effect of plunging plants, grown in non-nitrogenous nutrient solution, for 48 hours before inoculating into a humus solution

Aby wyjaśnić, czy stwierdzone dodatnie działanie rozpuszczalnej próchnicy wpływa na roślinę, czy też jedynie wzmaga wirulencję mikroba, przeprowadziłam następujące doświadczenie: część roślin umieściłam w pożywce, a część w roztworze, zawierającym ponadto

próchnicę, nie szczepiąc ich. Po 48 godzinach zlałam pożywkę z dodatkiem próchnicy, przemyłam korzenie roślin, napełniłam kolby jednakową pożywką o wyżej podanym składzie i zaszczerpiłam. Kolb było 8, cztery małe na 340 cm³ i cztery duże na 1200 cm³. Aseptyczność wobec przemywania nie była ściśle zachowana, lecz zakażenie z powietrza nie nastąpiło w żadnym wypadku. Siew nastąpił 27 IV 1938 do sterylizowanych probówek z agarem. Zasadziłam do kolb dużych po dwie roślinki i po jednej do małych 7 V, zlałam pożywkę z próchnicą i zaszczerpiłam po 48 godzinach. Likwidacja nastąpiła 9 VI. Okres wegetacyjny trwał 43 dni, doświadczenie 33 dni. W czterech kolbach dużych przeprowadziłam powtórne szczepienie po 12 dniach od pierwszego szczepienia. Rośliny w tych kolbach rosły do dnia 22 VI, tj. o 13 dni dłużej. Brodawki we wszystkich wystąpiły równocześnie, 26 dnia po wysiewie. W kolbach dużych były wszędzie identyczne warunki dla wtórnej infekcji, natomiast infekcja pierwotna, nieujawniona, lecz dokonana mogła przebiec niejednakowo. Wyniki podaje tabela II i tabela II a. Rozwój brodawek

TABELA (TABLE) II

Wpływ zanurzenia roślin, hodowanych w pożywce bezazotowej, w roztworach próchnicy przez 48 godzin przed szczepieniem
Effect of humus solution in which roots of plants grown in non-nitrogenous nutrient solution remain immersed 48 hours before being inoculated

Kombinacja Components of medium	pH 21 VI	Ilość brodawek Number of nodules	Waga brodawek w g Weight of nodules in g	Waga 1000 brodawek w g Weight of 1000 nodules in g	Zawartość N w roślinach bez brodawek w mg Amount of N in the plants without nodules in mg
A Pożywka — Nutrient solution	6·5	180	0·2288	1·271	74·2
B Pożywka — Nutrient solution	6·5	157	0·1784	1·136	—
C Pożywka i kwasy próchniczne przez cały czas doświadczenia Nutrient solution and humic acids added in permanence	6·5	209	0·2793	1·336	—
D Pożywka i 0·2% hum. potasow. przez 48 g. przed szczepieniem Nutr. solution and 0·2% hum. potassium during 48 hours before inoculation	6·5	438	0·4057	0·926	89·4

TABELA (TABLE) IIa

Wpływ zanurzenia roślin, hodowanych w pożywce bezazotowej, w roztworach próchnicy przez 48 godzin przed szczepieniem (dwukrotne szczepienie)

Effect of plunging the roots of pea-plants into humus solution during 48 hours before inoculating (twice inoculated, *i. e.* at once and again 12 days later)

Kombinacja Components of medium	pH 22 VI	Ilość brodawek Number of nodules	Waga brodawek w g Weight of nodules in g	Ilość brodawek jednej rośliny w g Per one plant no- dules in g	Waga 1000 broda- wek w g Weight of 1000 nodules in g
A Pożywka — Nutrient solution	6.5	703	1.1155	351	1.5860
B 0.02% humianu potasu przed I szczepieniem 0.02% hum. potassium before I. inoculation	6.5	745	1.4900	372	2.0000
C Jak A — Like A *	6.5	862	1.1752	431	1.3630
D Jak B — Like B *	6.5	470	0.7921	235	1.5570
* Jedna roślina uszkodzona. — One plant injured.					

był w tych warunkach silny. Kwasy próchniczne w ilości 0.2 mg w 100 cm³ roztworu okazały się, przy stałym działaniu na korzenie roślin, ilością zbyt nikłą, by spowodować wystąpienie różnic. Humian potasowy w roztworze, działającym podczas 48 godzin przed szczepieniem, sprzyjał przebiegowi infekcji. Odporność grochu została obniżona, mamy tu więc do czynienia z działaniem próchnicy na rośliny. Powtórzenie szczepienia w okresie głodu azotowego musiało dać lepszy efekt tam, gdzie było więcej węglowodanów w korzeniach. Należy przypuścić, że działanie roztworu próchnicy wygasło po dniach 12, które dzieliły szczepienie drugie od pierwszego. Tu więc ilość brodawek nie może być większa u roślin, poddanych poprzednio działaniu próchnicy. Nie zaobserwowano więcej ognisk

zakażonych, lecz stwierdzono, że brodawki na korzeniach, których odporność osłabiono, są większe i cięższe. Wskazuje na to obok obserwacji waga brodawek w kolbie B i D (tab. II a) w stosunku do ich ilości, wyrażona w rubryce następnej. Na ogół i w następnych doświadczeniach potwierdza się fakt, że zwiększona ilość zwłaszcza drobnych, późno pojawiających się brodawek przeszkadza dobremu rozwojowi całego zespołu infekcyjnego: wielkość i waga na tym cierpi. W jednej tylko próbnej analizie znalazłam zwiększenie suchej masy o 10%, a zawartość azotu o 20%, co może być uważane za wynik jedynie orientacyjny.

Doświadczenie III — Experiment III

Wpływ działania próchnicy rozpuszczalnej i azotanu wapniowego na wiązanie brodawek korzeniowych u grochu w zwykłych kulturach wodnych

Effect of soluble humus substances on the development of nodules on the roots of pea-plants in simple water cultures

Doświadczenie miało cel ten sam, co doświadczenie I, jedynie różniło się metodą: było przeprowadzone w zwykłych niesterylizowanych słojach jednolitrowych z roślinami, utrzymującymi się na parafinowanych krążkach drewnianych. Długość okresu wegetacyjnego wynosiła 22 dni, siew 1 VI 1937, założenie na krążki i zaszczerpienie 4 VI. Szczepienie ponowiłam 9 VI — różnice między roztworami były także takie jak i w doświadczeniu I. W każdym słoju rosły 3 rośliny. Przewietrzano jak zwykle. Wyniki podaje tabela III.

Doświadczenie powyższe wykazuje zupełną zgodność z wynikami doświadczenia I. Dodatek humianu potasowego do pożywki zwiększa przeszło dwukrotnie ilość brodawek oraz ich wagę. Dodatek 0.01% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ okazał się w tych warunkach nazbyt wielki i hamował rozwój brodawek całkowicie, tak samo jak dawka wyższa 0.05%. Natomiast przy 0.01% saletry dodatek humianu potasowego niweluje zahamowanie, zwłaszcza w niższym procencie 0.002%. Poza tym azot mineralny wzmaga odporność roślin, a próchnica wybitnie ją osłabia przy czym ilość jej może być nieznaczna. Azotan działał także hamująco na wydłużenie korzeni, które stawały się krótkie i silnie zgrubiałe; przy wyższym procencie próchnicy te zgrubiałe korzenie, wokół których zaczynał strącać się humian, obumierały na końcach.

TABELA (TABLE) III

Wpływ działania próchnicy rozpuszczalnej i azotanu wapniowego na wiązanie brodawek korzeniowych grochu (zwykle kultury wodne)

Soluble humus substances influencing the development of root nodules of pea-plants (simple water cultures)

Kombinacja Composition of medium	Ilość brodawek Number of nodules	Ilość bro- dawek jed- nej rośliny Nodules per one plant	Waga bro- dawek w g Weight of nodules in g	Waga 1000 brodawek w g Weight of 1000 nodules in g
Pożywka Nutrient solution	175	58	0.0902	0.5720
Pożywka * + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01% Nutrient solution added $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01%	—	—	—	—
Pożywka ** + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.05% Nutrient solution added $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.05%	—	—	—	—
Pożywka + humian potasu 0.02% Nutrient solution added hum. potassium 0.02%	410	137	0.2190	0.5340
Pożywka + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01% + humian potasu 0.02% Nutrient solution added $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01% + hum. potassium 0.02%	190	63	0.1050	0.5520
Pożywka + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01% + humian potasu 0.002% Nutrient solution added $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01% + hum. potassium 0.002%	390	130	0.1674	0.4290
Pożywka *** + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.05% + humian potasu 0.02% Nutrient solution added $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.05% + hum. potassium 0.02%	—	—	—	—
Pożywka + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.05% + humian potasu 0.002% Nutrient solution added $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.05% + hum. potassium 0.002%	—	—	—	—

* Korzenie zgrubiałe, krótkie. — Roots short, swollen.

** Korzenie zgrubiałe, krótkie, obumierające na końcach. — Roots short, swollen ends decaying.

Doświadczenie IV — Experiment IV

Wpływ zanurzenia korzeni grochu w roztworach próchnicy przez 48 godzin przed
zaszczepieniem (kultury wodne w zlewkach)

Effect of plunging roots of pea-plants into soluble humus substances for 48 hours
before inoculation (water cultures growing in flasks)

Doświadczenie IV przeprowadzone zostało w zlewkach o objętości 400 cm³, część roślin przed szczepieniem 17 V 1938 zanurzyłam korzeniami w roztworze kwasów próchnicznych lub 0·02% humianu potasowego. Roztwór kwasów próchnicznych był rozcieńczony do zawartości 10·6 mg czystych kwasów na 100 cm³ roztworu. Brodawki w tym doświadczeniu pojawiły się 18 dnia po zasiewie, dokonanego 13 V 1938. Likwidacja nastąpiła 43 dnia wegetacji, a 39 od zaszczenia. W zlewkach nie szczepionych brodawki wystąpiły już 15 dnia, co dowodzi, że użyty do szczepienia pień miał wirulencję osłabioną. W nieszczepionych zlewkach nie liczyłam brodawek. Wyniki podaje tabela IV. Szczepienia dokonywałam trzema sposobami w sześciu kombinacjach: z rozniecionej brodawki, kulturą rozmieszaną z wodą i przecikiem z kultury (po pasażowaniu), natychmiast i po 48 godzinach od chwili wyjęcia z roztworów próchnicznych. Wyniki są zupełnie zgodne z otrzymanymi w doświadczeniu II. Ilość brodawek na roślinach, poddanych osłabiającemu odporność działaniu próchnicy, jest większa a waga ich wyższa.

Zbytńio stężony roztwór kwasów próchnicznych działał patologicznie na rozwój korzeni, powodując silny skręt strefy wzrostowej. Po przełożeniu krążków na słoje dalszy wzrost był normalny. Osłabiające odporność działanie próchnicy nie ustawało po 48 godzinach od chwili zmiany pożywki na nie zawierającą próchnicy.

Doświadczenie V — Experiment V

Wpływ zanurzenia korzeni grochu do roztworów próchnicy przez 48 godzin przed
szczepieniem w kulturach wodnych, rosnących w stojach

Effect of plunging the roots of pea-plants into soluble humus substances for
48 hours before inoculation, in water cultures, growing in flasks

Doświadczenie to było powtórzeniem poprzedniego, jednak przeprowadzono je o tyle staranniej, że wszystkim roślinom dano tę samą ochronę od dalszych zakażeń. Zasiałam groch 25 V 1938, 1 VI przełożyłam krążki z roślinami ze słoja do szerokich naczyń z roztworami próchnicy, 3 VI zaszczepliłam wszystkie słoje jednako, rozpylając na korzenie wodę rozmieszaną z kulturą czystą, a poza tym z rozniecionych brodawek grochu, który w poprzednim doświadczeniu uległ zakażeniu z powietrza. Groch rósł odtąd w czystej pożywce. Szczepienie mogło być dokonane zatem kilku pniami

TABELA (TABLE) IV

Wpływ zanurzenia korzeni grochu do roztworów próchnicy przez 48 godzin przed szczepieniem (kultury wodne w zlewkach).
Effect of plunging the roots of pea-plants into soluble humus substances during 48 hours before inoculation (water cultures in flasks)

Pożywka Nutrient solution	Ilość brodawek Number of nodules			Ilość brodawek jednej rośliny Number of nodules per one plant			Waga brodawek w g Weight of nodules in g			Waga 1000 brodawek w g Weight of 1000 nodules in g		
Szczepienia bezpośrednie wykonane metodą: — Inoculated instantly with aid of the method:												
Mineralna — Mineral	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Korzenie zanurzone na 48 godzin do hum. pot. 0.02% przed szcz. The roots immersed in hum. potassium 0.02% 48 hours before inoculation	533	507	201	67	169	177	0.5810	0.7080	0.8280	2.8900	1.3960	1.5530
Korzenie zanurzone na 48 godzin do hum. pot. 0.02% przed szcz. The roots immersed in hum. potassium 0.02% 48 hours before inoculation	680	798	850	226	283	253	0.8750	0.8560	1.1080	1.2870	1.0720	1.3040
Korzenie zanurzone na 48 g. do roztworów kwasów próchn. przed szcz. The roots immersed in humic acids 48 hours before inoculation	649	691	937	216	230	312	0.8840	0.9610	1.5148	1.2060	1.3890	1.6160
Szczepienia wykonane 48 godzin po wyjęciu z roztworu próchniczego metodą: Inoculated 48 hours after lifting out of the humus solution:												
Korzenie zanurzone na 48 godzin do hum. pot. 0.02% przed szcz. The roots immersed in hum. potassium 0.02% 48 hours before inoculation	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
	316	303	585	105	101	194	0.6475	0.7425	0.9180	2.0490	2.4500	1.5790
Korzenie zanurzone na 48 g. do roztworów kwasów próchn. przed szcz. The roots immersed in humic acids 48 hours before inoculation	757	785	680	226	261	252	0.8750	0.8233	0.8750	1.1290	1.0480	1.2870

Metoda I oznacza szczepienie z rozniezionej brodawki. — Method I: inoculation with crushed nodule.
Metoda II oznacza szczepienie z kultury, bakterie zmieszane z wodą. — Method II: inoculation with culture in water.
Metoda III oznacza szczepienie pęciakiem z kultury. — Method III: inoculation with switch from culture.
pH 6.5 we wszystkich kombinacjach. — pH 6.5 in all combinations.

bakterii równocześnie, podobne do naturalnego. Użyty roztwór kwasów próchnicznych zawierał tylko 2·44 mg próchnicy w 100 cm³ roztworu, będącego zwykłą pożywką bezazotową. Roztwór humianu był przyrządzony jak zwykle, 0·2 g humianu na 1 litr pożywki. Dnia 14 wegetacji, a 6 po zaszczepieniu pojawiały się nieliczne brodawki w słojach, gdzie rosły rośliny trzymane poprzednio przez 48 godzin w pożywce z dodatkiem humianu. W pożywce zwykłej pojawiły się dopiero po 16 dniach od zasiewu; również rośliny poddane działaniu kwasów próchnicznych przez 48 godzin wytworzyły brodawki tego samego dnia. Likwidacja nastąpiła 6 VII po 42 dniach wegetacji. Wyniki przedstawia tabela V. Są one jednoznaczne z wykonanymi

TABELA (TABLE) V

Wpływ zanurzenia korzeni grochu do roztworów próchnicy przez 48 godzin przed szczepieniem (kultury wodne w słojach)
Effect of plunging roots of pea-plants into humus solutions during 48 hours before inoculation (simple water cultures in test flasks)

Korzenie zanurzone przez 48 godzin przed szczepieniem Roots immersed 48 hours before inoculation	Średnia (z trzech roślin) ilość brodawek jednej rośliny Average (of three plants) amount of nodules per one plant	Waga brodaw. w g Weight of nodules in g	Waga 1000 brodawek w g Weight of 1000 nodules in g
do pożywki mineralnej into nutrient solution	339 274 275	0·6495 0·9299 0·9350	0·9560 1·1320 1·1310
do pożywki z dodatkiem kwasów próchnicznych into nutrient sol. with humic acids	150 141	0·7765 1·2055	2·5888 1·6690
do pożywki z dodatkiem humianu potasu 0·2% into nutrient solution with hum. potassium 0·2%	145 157 121	0·8205 1·0465 1·1660	2·8290 2·2290 3·2030

poprzednio. Zanurzenie do roztworów próchnicznych podnosi wagę wszystkich brodawek o około 20—25 %, waga w stosunku do ilości (1000 sztuk) wzrasta 2—3 krotnie. Ilość natomiast była w tym doświadczeniu większa w słojach z pożywką. Wniosek stąd następujący: 1) Zanurzenie na ograniczony przeciąg czasu do roztworów próchnicznych zmniejsza odporność korzeni grochu na infekcję bakteriami korzonkowymi w zwykłych kulturach wodnych. Jednocześnie dobrze rozwijający się zespół pierwotnych brodawek ogranicza ilość tworzących się później. Było to widoczne na korzeniach gro-

Ryc. 4. Wygląd korzeni grochu zanurzonego do roztworów kwasów próchnicznych. — The roots of pea-plants immersed in solutions with humic acids:

1. pożywka — the mineral nutrient solution,
2. kwasy próchniczne — the nutrient solution with humic acids.

Ryc. 5. 0. pożywka — the mineral nutrient solution,

1. pożywka — the mineral nutrient solution,
2. humian potasowy — the nutrient solution with potassium humate,
3. humian potasowy — the nutrient solution with potassium humate.

chu rosnącego przez cały czas w pożywce, pojawiało się tam wyraźnie drugie piętro brodawek, położone na młodszych korzeniach, a złożone wyłącznie z drobnych brodaweczek. Uwidoczniają to ryciny 4 i 5. Poza tym dał się zauważyć dodatni wpływ humianu na wydłużenie korzeni bocznych.

Doświadczenie VI — Experiment VI

Wpływ próchnicy rozpuszczalnej na rozwój brodawek korzeniowych grochu u roślin, rosnących w sterylizowanym piasku

Effect of soluble humus substances on the development of nodules on roots of pea-plants when growing in sterilized sand

Doświadczenie to przeprowadziłam w kulturach doniczkowych w sterylizowanym piasku metodą szczepienia nasion, przy czym na aseptyczność nie zwracałam uwagi, chodziło jedynie o jednakowe warunki szczepienia. Dwie doniczki otrzymały pożywkę bezazotową w ilości 60 cm³. Do trzech następnych doniczek dodano tę samą ilość pożywki zawierającej ponadto kwasy próchniczne. Zapas azotu w piasku nie był oznaczony. Podlewałam rozcieńczoną pożywką w sposób podany przy opisie metody. Wyniki przedstawia tabela VI.

TABELA (TABLE) VI

Wpływ próchnicy rozpuszczalnej na rozwój brodawek korzeniowych grochu u roślin rosnących w sterylizowanym piasku

Effect of soluble humus substances on the development of root nodules on pea-plants when growing in sterilized sand

Kombinacja Components of medium	Ilość brodawek Number of nodules		Waga brodawek w g Weight of nodules in g		Waga 1000 brodawek w g Weight of 1000 nodules in g	
	Średnia dla jed- nej rośl. Average per one plant		Średnia dla jed- nej rośl. Average per one plant		Średnia Average	
Pożywka mineralna Nutrient solution	175 140	52	0.1085 0.1420	0.1232	0.6 1.0	0.8
Pożywka z dodatkiem kwasów próchnicznych 2.93 mg Nutrient solution with humic acids 2.93 mg	164 186 124	53	0.2400 0.1635 0.2160	0.2065	1.5 0.9 1.7	1.4

Uwaga: Można przypuścić, że próchnica strącała się z czasem, gdyż jednakowa ilość brodawek w obu szeregach wskazuje na ustanie działania roztworu próchnicy.

Zasiałam groch 2 V, zlikwidowałam doświadczenie 7 VII 1938. Okres vegetacyjny zatem wynosił 37 dni. Przyrost wagi brodawek u roślin, które wyrosły w piasku z próchnicą wynosi 65%, jakkolwiek ilość brodawek jest w porównaniu z roślinami, które otrzymały tylko pożywkę, ta sama. Średnia waga brodawki na pożywce z próchnicą jest o 75% wyższa od wagi brodawki, która wyrosła bez próchnicy. Wynik zgodny jest z poprzednimi obserwacjami: im bardziej zakażenie może być wielokrotne i różnorodne, tym bardziej próchnica działa na jakość brodawek, ich wagę, a mniej na ilość. Rośliny przez tę mniejszą ilość są dostatecznie opanowane i stają się odporne na dalsze zakażenia. Ogólnie biorąc ilość brodawek na jednej roślinie była w tych warunkach znacznie mniejsza, niż w kulturach wodnych.

Omówienie wyników

Badania wpływu próchnicy na infekcję grochu przez bakterie brodawkowe szły w kierunku poznania działania próchnicy na bakterie oraz na rośliny przez nie zakażone. Obserwacje, dotyczące wzrostu czystych kultur na pożywkach agarowych lub żelatynowych z glukozą, asparaginą i źródłem soli mineralnych, prowadzą do następujących wniosków:

Działanie kwasów próchnicznych rozpuszczalnych w wodzie, jako czynników wzrostu dla *Bacillus radicicola* Beij. jest prawdopodobne. Mechanizm owego stymulującego działania w obecnej chwili jest całkowicie nieznany. Nie wiadomo, czy chodzi o działanie specyficznie chemiczne, czy o fizyczną strukturę związku stymulującego. Jeśli weźmiemy pod uwagę, że stymulantami dla bakterii korzonkowych okazały się takie substancje, jak agar, wyciąg z roślin, kwasy próchniczne, wyciąg z melasy, z drożdży (29), z grzybka *Aspergillus niger*, to zauważymy, że część tych substancji ma w ogóle specyficzne własności pobudzania i wpływania na wzrost roślin. Agar, wyciągi z roślin oraz kwasy próchniczne rozpuszczalne warunkują normalny wygląd korzonków kukurydzy, hodowanych in vitro (30).

Druga część moich doświadczeń, przeprowadzonych metodą kultur vegetacyjnych w środowisku wodnym lub w sterylizowanym piasku przy użyciu metody aseptycznych kultur Virtanena lub w zwykłych kulturach, dała następujące wyniki:

1) O ile rośliny grochu poddajemy działaniu roztworów próch-

(29) Allison, Walker, Virtanen, l. c.

(30) Wójcikówna Z. i Pestka M.: Warunki rozwoju wyizolowanych tkanek embrionalnych (nieogl.).

nicy na korzenie przez czas 48 godzin, a po usunięciu tego działania rośliny szczepimy czystą kulturą *Bacillus radicicola* Beij. natiychmiast lub po upływie 48 godzin, to brodawki korzeniowe pojawiają się wcześniej, są większe i cięższe. Objawia się to zwiększoną wagą całego zespołu brodawek oraz średnią wagą pojedynczej brodawki (liczoną na 1000 sztuk). Brodawki, tworzące się później na młodych korzeniach rośliny, usuniętej spod wpływu próchnicy lub na korzeniach roślin, które nigdy osłabiającemu odporność działaniu nie ulegały, mogą być dość liczne, lecz drobne i znacznie słabiej rozwinięte.

2) O ile poddajemy groch stałemu działaniu rozpuszczalnych kwasów próchnicznych, to ilość, waga wszystkich brodawek oraz rozwój pojedynczej brodawki są zawsze około dwukrotnie lepsze niż w kulturach kontrolnych, w których rośliny rosną w pożywce bez próchnicy.

Zjawisko to z jednej strony jest bezwątpienia wynikiem osłabienia odporności, jaką groch posiada wobec zakażenia bakteriami korzonkowymi, równocześnie jednak możemy przypuścić także bezpośredni wpływ na organizm zakażający. Ze względu na odmienność warunków, jaką przedstawia życie symbiotyczne z rośliną wobec rozwoju na sztucznej pożywce, nie będziemy nigdy pewni, wiającwszy pod uwagę dużą zmienność właściwą dla *Bacillus radicicola*, czy działanie stwierdzone na pożywce występuje również w brodawce korzeniowej. Istnieje jednak duże prawdopodobieństwo, że i mikroorganizm doznaje w roztworze pewnego bodźca działającego w kierunku wzrostu.

Jakie jest wytłumaczenie wzmożonej wirulencji bakterii pod wpływem rozpuszczalnych kwasów próchnicznych? Najprostsze będzie przypuszczenie, że czynna tu jest wzmożona przepuszczalność plazmy w korzeniach grochu. Powołam się tutaj na równocześnie i w latach poprzednich prowadzone w Zakładzie Fizjologii Roślin i Chemii Rolnej Uniwersytetu Poznańskiego doświadczenia (31), wykazujące intensywniejsze pobieranie soli mineralnych u roślin, rosnących w roztworach badanych z dodatkiem próchnicy. Ponadto zauważono, że włósniki w takich roztworach (32) pojawiają się

(31) Niklewski B. i Wojeiechowski J.: Wpływ związków próchnicznych na pobieranie fosforanu amonu $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ i siarczanu amonu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ przez rośliny. — Acta Soc. Bot. Pol. XV, nr 2, 1938.

Kuźdowicz A. — (Praca nie opublikowana).

(32) Niklewski B. i Wojeiechowski J. — Zschrft f. Bodenkunde u. Pflanzenähr. B. 4 (49), 1937, 294.

szybciej, są liczniejsze i dłuższe. Jeśli zatem więcej jest włóśników i pozwalają one na łatwiejsze wtargnięcie pałeczek mikroba, dokonuje on tego wcześniej i z mniejszym nakładem energii. Wówczas dopływ węglowodanów do korzeni, warunkujący chwilę pojawiania się brodawek, zastaje bakterie liczniejsze i silniejsze, stąd intensywność rozwoju. Zaobserwowane w doświadczeniu V wcześniejsze o dwa dni pojawienie się brodawek dowodzi ponadto, że mniejsze nagromadzenie węglowodanów już wystarcza do wywołania zwykłych zmian histologicznych.

Przy porównaniu działania roztworu czystych kwasów próchnicznych z działaniem roztworu preparatu torfowego, zawierającego humian potasowy, drobna różnica wypadnie na korzyść tego ostatniego. Stwarza on zdaje się szczególnie korzystne dla rozwoju grochu warunki środowiska.

Różnica dni, które upływały do chwili pojawienia się brodawek na korzeniach, mianowicie 26 i 18 od dnia zasiewu, tłumaczy się tym, że użyto odmiennego nasienia grochu.

Zestawienie wyników

Rezultaty doświadczeń dają się ująć w następujące wnioski:

I. Jest prawdopodobne, że rozpuszczalna w wodzie próchnica stanowi pewien czynnik, stymulujący wzrost bakterii korzonkowych grochu w roślinie i na pożywcę.

II. Równocześnie rozpuszczalne związki próchniczne wpływają osłabiająco na odporność grochu wobec infekcji bakteriami korzonkowymi, podnosząc ilość, wagę wszystkich brodawek i masę pojedynczej brodawki lub tylko wagę całego zespołu i ciężar pojedynczych narośli.

III. Osłabienie odporności daje się wytłumaczyć zwiększoną przepuszczalnością plazmy komórek skórki u korzeni grochu oraz lepszym i szybszym wytworzeniem włóśników.

W zakończeniu mojej pracy pragnę gorąco podziękować Kierownictwu Zakładu Fizjologii Roślin i Chemii Rolnej Uniwersytetu Poznańskiego, przede wszystkim p. prof. B. Niklewskiemu za inicyjatywę oraz czuwanie nad właściwym kierunkiem przeprowadzonych doświadczeń; p. drowi J. Wojciechowskiemu dziękuję za zyczliwą pomoc i wskazówki. Łaskawemu pozwoleniu p. prof. Artturi

Virtanen w Helsinkach zawdzięczam zapoznanie się z metodami, którymi posługuje się jego pracownia, a które poznałam dzięki bardzo szczegółowym objaśnieniom, jakich mi uprzejmie udzieliły panie: dr Synnöve van Hausen i mgr Saara Saastamoinen.

Z Zakładu Fizjologii Roślin i Chemii Rolnej Uniw. w Poznaniu.

Discussion of results

The work in question deals with two kinds of experimental materials: pure root nodule bacteria cultures derived from pea plants, and plants inoculated with these cultures. Observations made on pure cultures grown on nutrient media such as agar or gelatine with glucose, asparagine and a source of mineral salts, have led to the following conclusion:

The action of humic acids soluble in water, as growth promoting substances on the *Bacillus radicola* Beij. organism is very probable.

The mechanism of this stimulating activity is entirely unknown as yet. We thus do not know whether a specific chemical action occurs, or whether it is just the physical structure of the stimulating solutions in question we have to determine. As soon as we state that the stimulating substances are proved to be either agar, or extract of plants leaves, humic acids, extract of molasses, of yeast, of the fungus *Aspergillus niger* (33), we notice that some of these substances are particularly fit to influence growth in plant life in general. Agar, plant extracts and humic acids soluble in water are the conditional agents without which no normal development of *Zea mais* roots, when grown in vitro, will take place (34).

The second part of my experiments dealing with water and sand cultures of pea-plants made partly by means of the Virtanen aseptical method, partly without it, has given the following results:

I. Pea plants, when their roots are brought for 48 hours under the action of humus solutions and inoculated — either at once or two days later but in both cases after having been withdrawn from under that influence — with a pure culture of *Bacillus radicola* Beij., will produce root nodules earlier, and those nodules will be bigger and heavier than under usual circumstances. The weight of all the

(33) Allison, Walker, Virtanen l. c.

(34) Wójcikówna Z. i Pestka M.: Warunki rozwoju wyizolowanych tkanek embrjonalnych (Not yet published).

nodules as well as of the total is larger, and the difference in weight of a single nodule may be stated when taking the average weight of 1000 specimens. Fresh nodules produced by young roots which were never exposed to the action of those humus substances and which therefore are still in possession of their unweakened power of resistance against the inoculation, may be fairly numerous, yet of small size and weight. We notice the same when watching plants which were never brought under the action of those substances, as they were grown all the time in pure nutrient solution.

II. The roots of pea plants, if exposed during all the time of their growth to the influence of soluble humus substances, will always produce nodules which are about twice the quantity, size and weight of those grown under control in pure nutrient solution without humus substances, and this enlargement may be stated with respect to all the nodules together as well as to a single specimen.

This phenomenon is doubtless the result of impairment of the resistance which pea plants naturally show against inoculation with root nodule bacteria. On the other hand we may presume that a direct effect on the inoculating organism is being exerted. Considering the variety of conditions which exist in symbiotic life with plant and growths in nutrient media, and also the great variability of nodule organism, we can never make sure whether the efficiency we stated in pure culture, exists likewise in the root nodule. There is a great probability that the micro-organism, when in humus solutions, is likewise subject to the activity of a growth accelerating stimulus.

How is this increase of bacterial virulence to be explained? The most obvious hypothesis is this: in the roots of host plants we meet with a greater permeability of plasma. I should here refer to present and former work done in the Institute of Plant Physiology and Agricultural Chemistry of the University of Poznań. Experiments performed there have shown that plants grown in humus solutions absorb mineral salts more intensively. We have also noticed that root hairs make their appearance more promptly and grow longer and ranker than usual (35), (36). Now, if there are

-
- (35) Niklewski B. a. Wojciechowski J.: The influence of humic compounds on the absorption of ammonium phosphate — $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and sulphate — $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ by plants. — *Acta Soc. Bot. Pol.* XV, nr 2, 1938.
- (36) Niklewski B. i Wojciechowski J. — *Zeitschr. f. Bodenkn. u. Pflanzenernähr.* B. 4 (49), 1937, 294.
- Kuźdowicz — (not yet published).

more root hairs the invasion of bacteria is facilitated and the whole work is performed in less time and with less expense of energy. In this way an accumulation of carbohydrates takes place simultaneously with the better development of bacteria, and that is the reason why nodules are developed more intensively. It is obvious that owing to an earlier appearance of nodules (experiment V), a smaller amount of carbohydrates is sufficient to effect the usual histological changes.

Conclusion

The results of experiments on the above subject may be recapitulated in brief as follows:

I. We may presume with great probability that humus substances soluble in water (humic acids and humate potassium) constitute a growth-promoting substance for *Bacillus radicicola* in plant nodules and in the nutrient media.

II. Likewise soluble humus substances exert a weakening influence on the power of resistance which pea plants show against inoculation with root nodule bacteria; the number and weight of all nodules, of a total as well as of single ones, are hereby increased, or this increasing effect relates to the weight of the total of nodules and of single ones alone.

III. Such diminished power of resistance is likely to be the consequence of increased permeability of rhizodermal plasma in the roots of pea plants, also of better and quicker development of root hairs in plants brought under the action of soluble humus substances.

Now, when closing my researches, I wish to express my deepest gratitude to the Director of the Institute of Plant Physiology and Agricultural Chemistry of the University of Poznań, Professor Niklewski, whose initiative and steady control enabled me to carry through my experimental work in the proper way.

I should also like to thank J. Wojciechowski, D. Sc. for his helpful assistance and instructions.

I am no less indebted to Professor Artturi Virtanen of Helsinki, who kindly consented to my being initiated into the methods

of scientific researches as practised in his laboratory, to my being given most detailed explanations by: Mesdames Synnöve van Hausen D. Sc. and Saara Saastamoinen.

From the Institute of Plant Physiology and Agricultural Chemistry of the University of Poznań (Poland).