

Отзивчивост на папуда (*Vigna unguiculata* L.) към инокулация с азотфиксиращи бактерии

Радка Донкова *, Костадинка Недялкова, Йонита Перфанова, Христо Вълчовски

Институт по почвознание, агротехнологии и защита на растенията „Н.Пушкарров” - София

E-mail:* radadonkova@gmail.com

Резюме

В съдов опит е проучена отзивчивостта на папуда (*Vigna unguiculata* L.) към инокулация с азотфиксиращи бактерии от р. *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*. В проучването са включени три сорта папуда, 5 щамове *Bradyrhizobium japonicum* и 1 щам *Rhizobium spp.* Установено е, че инокулацията на папудата с всички щамове *Bradyrhizobium japonicum* повишава грудкообразуването и формираното количество зърно. *Rhizobium spp.* влияе положително върху тези параметри само при папуда сорт „Хриси”. Подбрани са ефективни двойки „сорт папуда - щам *Bradyrhizobium japonicum*”, които се предлагат за изпитване в полски условия.

Ключови думи: инокулация, папуда, азотфиксиращи бактерии, вирулентност, ефективност

Response of Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) to Inoculation with Nitrogen Fixing Bacteria

Radka Donkova, Kostadinka Nedyalkova, Jonita Perfanova, Hristo Valchovski

Institute of Soil Science, Agrotechnology and Plant Protection “N. Poushkarov” - Sofia

Abstract

The response of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) to inoculation with nitrogen fixing bacteria of genus *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* were tested in pot experiment. Three varieties of cowpea, 5 *Bradyrhizobium* strains and 1 *Rhizobium* strain were involved in the study. It was found that inoculation of cowpea with all *Bradyrhizobium* strains increased the nodule formation and grain yield. Inoculation with *Rhizobium* strain had positive effect on the studied parameters only in cowpea variety “Hrisi”. The effective pairs “cowpea variety – *Bradyrhizobium* strain” were suggested to be tested in field experiments.

Key words: inoculation, cowpea, nitrogen fixing bacteria, nodulation, effectiveness

В съвременните условия на земеделие се повишават изискванията за екологична безопасност на новите технологични системи. Успешен начин за постигане на тези цели е увеличаването дела на „биологичния” азот в растителната продукция чрез отглеждане на бобови култури. В симбиоза с бактериите от родове *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* и други те фиксират атмосферен азот и обогатяват почвата с 4 до 30 кг азот на декар в зависимост от вида на бобовата култура и условията за симбиотична азотфиксация.

В световен мащаб отглеждането на алтернативни бобови култури, каквато е папудата, все повече се разширява.

Папудата (*Vigna unguiculata* L.) е важна земеделска култура за много страни в Африка, Австралия, Северна и Южна Америка и Западна Индия. Не е взискателна към почвата - може да бъде отглеждана, както на засолени, така и на алкални почви. Важно качество особено в настоящите условия на глобално затопляне (Mayeux, 1990) е нейната сухоустойчивост. Папудата се отглежда предимно за храна на хората, но тя е алтернативен източник на протеин и енергия и за селскостопанските животни. Семената ѝ съдържат 24 – 26% суров протеин, 51% въглехидрати, 4% минерални вещества, и 3% витамини (Afzal et al., 2008).

Папудата в симбиоза с почвени бактерии от сем. *Rhizobiaceae*, главно *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* (Mреperеrеkі et al., 1996) фиксира атмосферен азот и по този начин обезпечава от 66% до 99% от необходимия за нормалното си развитие азот (Pule-Meulenberg et al., 2010; Naab et al., 2009).

Както в България, така и в чужбина отдавна се извършват проучвания за стимулиране на симбиотичната азотфиксация при бобови култури чрез използване на високоефективни щамове грудкови бактерии под формата на различни биопрепарати. За получаване на биологично свързан азот от съществено значение е подборът на генетично съвместими двойки сорт папуда – щам грудкови бактерии (Makoі et al., 2009). В световен мащаб съществуват редица изследвания, показващи влиянието на инокулацията на папуда с азотфиксиращи бактерии, водещи до увеличаване на добива от папуда и азотното съдържание в добива (Thiagarajan & Ahmad, 1992; Costa et al., 2011; Walp & Salem, 2013). В нашата страна изследвания в този аспект няма.

Цел на настоящото изследване е да се проучи отзивчивостта на три сорта папуда към инокулация с азотфиксиращи бактерии от р. *Bradyrhizobium* и р. *Rhizobium*.

Материал и методи

Изследването е проведено в съдови опити с алувиално ливадна почва (Fluvisol) (Цалапица), характеризираща се с рНН₂O – 6,6, хумус – 1,38%, сорбционен капацитет – 18,0 meq.100 g⁻¹, обемна плътност – 1,5 g.cm⁻³. Отгледани са три сорта папуда - новосъздадения български сорт „Хриси“ (Stoilova, 2012), отличаващ се с добра сухоустойчивост и два местни сорта (обозначени като сорт 1 и сорт 2) от Петричко-Сандански район. Преди засяване семената на папудата са инокулирани със суспензии от 7-дневни бактериални култури на различни щамове *Br.japonicum* и три дневна култура от *Rhizobium spp.* с титър 106 CFU.ml⁻¹. При определяне титъра на инокулатите сме се позовали на изследванията на Silva, 2014 и Trotman, 1985, посочващи, че най-добър ефект за папудата се постига при концентрация на инокулума в границите 105-107 CFU.ml⁻¹. Изпитани са пет щама *Bradyrhizobium japonicum* (273, 269, 272, 274 и 264) и един щам *Rhizobium* от колекцията азотфиксиращи бактерии, поддържана в секция „Микробиология на почвата“ при ИПАЗР. Опитът е изведен в съдове с вместимост 1,200 kg почва, взета от орния хоризонт.

За всеки сорт папуда експериментът включва вариантите: (1) контрола – неинокулирани семена; (2) семена инокулирани с *Br. japonicum* щам 273; (3) семена инокулирани с *Br. japonicum* щам 269; (4) семена инокулирани с *Br. japonicum* щам 272; (5) семена инокулирани с *Br. japonicum* щам 274; (6) семена инокулирани с *Br. japonicum* щам 264; (7) семена инокулирани с *Rhizobium spp.* щам 64. В съд са отгледани по две растения в 4 повторения при влажност 60% ПВ. Отзивчивостта на папудата сме определили чрез отчитане на основните свойства на грудковите бактерии вирулентност и ефективност. Вирулентността на изпитаните щамове е отчетена във фаза цъфтеж - начало на образуване на чушки, а ефективността им във фаза пълна зрялост чрез формираното количество зърно и съдържанието на протеин в него. Резултатите са обработени чрез дисперсионен анализ (SPSS).

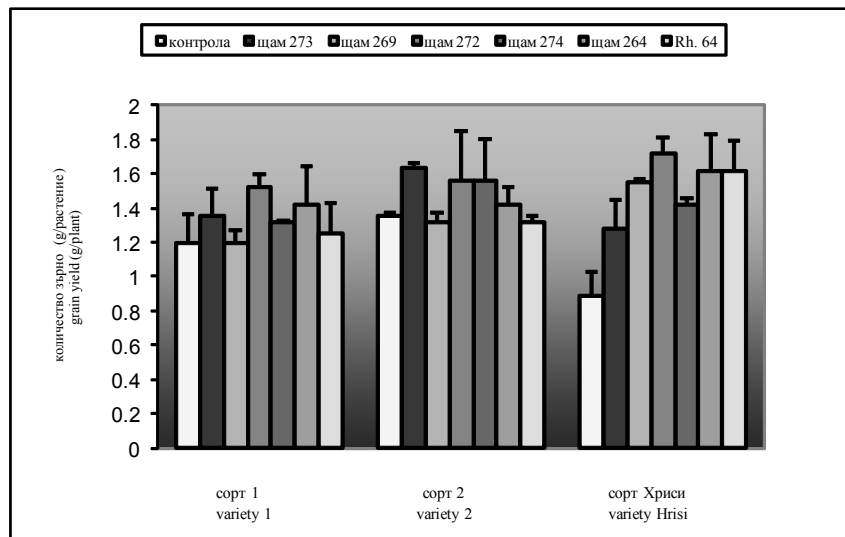
Резултати и обсъждане

Представените на таблица 1 данни показват, че при контролните варианти (неинокулирани семена) и при трите сорта папуда грудки не са образувани, което показва, че в тази почва няма естествено разпространени грудкови бактерии специфични за тази култура.

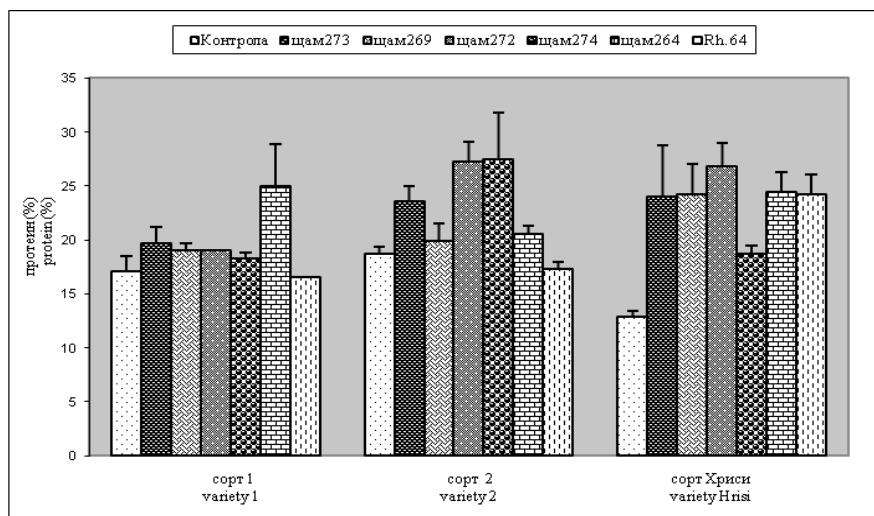
От трите сорта най-добра отзивчивост към инокулация показва сорт „Хриси“. При него грудки по корените на папудата не формира единствено *Br. japonicum* щам 274. Всички останали щамове формират грудки, които в сравнение с местните сортове папуда са с по-високо тегло (табл. 1). При сорт 1 грудки формират четири щама *Br. japonicum* - № 273, 269, 274 и 264. Най-много на брой, но най-дребни са образуваните грудки от *Br. japonicum* щам 264, което предполага и тяхната по-малка ефективност. При сорт 2 грудки формират *Br. japonicum* щамове 273, 269 и 264.

От данните се вижда, че най-силна инфектираща способност имат *Br. japonicum* щам 273, щам 264 и щам 269, при които са отчетени грудки и при трите сорта. Разлика е установена по отношение теглото на грудките. С най-малко тегло са те при сорт 1 и с най-голямо - при сорт „Хриси“. *Br. japonicum* щам 274 формира значително по-малко на брой и с по-малко тегло грудки само при сорт 1. *Br. japonicum* щам 272 формира незначително количество грудки при сорт 1 и сорт „Хриси“.

Rhizobium spp. има инфектираща активност само по отношение на сорт „Хриси“ (табл. 1).



Фиг.1. Количество формирано зърно от папуда
Fig. 1. Cowpea grain yield



Фиг. 2. Съдържание на протеин (%) в зърното на папуда
Fig.2. Protein content (%) in cowpea grain

Таблица 1. Вирулентност на азотфиксиращи бактерии при инокулация на папуда (брой и сухо тегло на формираните грудки)

Table 1. Nodulation of nitrogen fixing bacteria in cowpea (number and nodule dry weight)

Variant	Папуда сорт 1 Cowpea Variety 1		Папуда сорт 2 Cowpea Variety 2		Папуда сорт „Хриси” Cowpea Variety “Hrisi”	
	g/растение g/plant	брой number	g/растение g/plant	брой number	g/растение g/plant	брой number
Контрола/control	0,000	0 ± 0	0,000	0 ± 0	0,000	0 ± 0
Br.japonicum щам 273	0,023	17 ± 11	8,333	8 ± 4	23,666	24 ± 15
Br.japonicum щам 269	0,018	29 ± 15	11,666	12 ± 7	47,333	47 ± 37
Br.japonicum щам 272	0,001	1 ± 1	0,000	0 ± 0	2,000	2 ± 2
Br.japonicum щам 274	0,035	4 ± 4	0,000	0 ± 0	0,000	0 ± 0
Br.japonicum щам 264	0,163	127 ± 18	1,333	1 ± 1	4,000	4 ± 4
Rhizobium щам 64	0,000	0 ± 0	0,000	0 ± 0	0,333	2 ± 1

Тези наши данни са в противоречие с публикуваните от Costa et al. (2011) и Thiagarajan et al. (1992), показващи добра вирулентност за азотфиксиращите бактерии от р. *Rhizobium*, което би могло да се обясни с недобрата генетична съвместимост на местните сортове папуда и включения в изследването щам *Rhizobium*.

Получените резултати показват, че изпитвания щам *Rhizobium* и *Br.japonicum* щам 274 проявяват строга специфичност към сорта папуда, докато щамове *Br.japonicum* № 273, 269 и 264 са с по-широк спектър по отношение на сорта папуда.

Представените на фигура 1 данни илюстрират ефекта от инокулацията върху формираното количество зърно от папудата. Най-голям ефект се наблюдава при сорт „Хриси“, при който количеството зърно се увеличава с около 90%. Изключение правят вариантите с *Br. japonicum* щам 274, при който увеличението на зърното е с 44%, и *Br. japonicum* щам 272 с над 2 пъти увеличение.

При другите два сорта се установява липса на влияние при инокулация с *Rhizobium* spp., което се обяснява с невъзприемчивостта на тези сортове към инокулация с бактерии от този род (табл. 1). Увеличение на формираното количество зърно се установява при инокулация с *Br. japonicum*. Положително влияние на инокулациите на папуда с *Br. japonicum* съобщават и Martins et al. (2003). Резултати, доказващи различния по сила ефект, предизвикан от различни щамове азотфиксиращи бактерии се съобщават и от Pule-Meulenberg et al. (2010).

Ефектът от инокулациите е по-ясно проявен при сорт 1, при който най-голямо увеличение се регистрира при *Br. japonicum* щам 264 – 46%. При сорт 2 увеличението е най-голямо при инокулация с *Br. japonicum* щам 272 и щам 274.

От данните се вижда, че един и същи щам показва различна ефективност при изследваните сортове папуда. В такава насока са и данните на Sarr et al. (2009). Най-ясно това е проявено при *Rhizobium* spp. щам 64. При инокулация на семената, при сорт 1 и сорт 2 не се установява то се увеличава почти двойно. Освен това, един и същи щам може да има еднаква или близка ефективност при два сорта - например *Br. japonicum* щам 274, при който е отчетено увеличение на добива в границите 45-47% за сорт 2 и сорт „Хриси“. Общо взето, изследваните щамове показват най-висока ефективност при сорт „Хриси“, което може да се обясни с генотипа на растението, т.е. при

сорт „Хриси“ има най-добра съвместимост със включените в изследването щамове азотфиксиращи бактерии.

Ефективната симбиоза на папудата с изследваните щамове грудкови бактерии увеличава не само формираното количество зърно, но подобрява и неговото качество. Всички щамове *Br. japonicum* при изследваните сортове папуда повишават съдържанието на протеин в зърното за сметка на биологичния азот, натрупан в резултат на активната дейност на грудковите бактерии. Увеличението на протеина спрямо контролата зависи от сорта на растението и бактериалния щам (фигура 2). Средното увеличение за сорт Хриси е 11,85%, за сорт 1 – 9,52% и за сорт 2 – 11.32%.

Заклучение

Проведеното проучване показва, че инокулацията на папудата с подходящи щамове грудкови бактерии води до увеличаване на формираното количество зърно и подобряване на неговото качество. При папуда сорт „Хриси“ най-добри резултати са получени при инокулация с *Br. japonicum* щам 272, при папуда сорт 1 – с *Br. japonicum* щам 264 и при папуда сорт 2 - с *Br. japonicum* щам 272 и щам 274. Двойките се предлагат за изпитване в полски условия. От включените в изследването щамове грудкови бактерии папудата показва по-голяма отзивчивост към тези, принадлежащи към род *Bradyrhizobium*.

Литература

- Afzal, M. A., M. Murshad, M. A. Bakar, A. Hamid & A. B. M. Salahuddin, 2008. Mungbean Cultivation in Bangladesh, Pulse Research Station, Bangladesh Agricultural Research Institute, Gazipur, Bangladesh.
- Costa, E.M., R.S.A. Noberta, L.de V.Martins, F.H.C.Amaral & F.M. de S. Moreira, 2011. Yield and nodulation of (*Vigna unguiculata* L. Walp.) inoculated with rhizobia strains in Bom Jesu, PI, *Revista Ciencia Agronomica*, 42 (1), pp 1 - 7.(P).
- Makoi, J.H.J.R., S.M.B. Chimphango & F.D. Dakora, 2009. Effect of legume plant density and mixed culture on symbiotic N₂ fixation in five cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) genotypes in South Africa. *Symbiosis*, 48, pp. 57 – 67.
- Martins, L.M.V., G.R. Xavier, F.W. Rangel, J.R.A. Ribeiro, M.P.C. Neves, L.B. Morgado & N.G.Rumjanek, 2003. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. *Biol Fertil Soils*, 38, pp. 333 - 339
- Mayeux, A., 1990. Mung bean: prospects for cultivation in Botswana. *The Bulletin of Agricultural Research in Botswana*, 8, pp. 5 – 9

- Mpepereki, S., A.G. Wollum & F. Makonese, 1996.** Diversity in symbiotic specificity of cowpea rhizobia indigenous to Zimbabwean soil. *Plant Soil*, 186, pp. 167 – 171
- Naab, J. B., S.M.B. Chimphango & F.D. Dakora, 2009.** N₂ fixation in cowpea plants grown in farmers' fields in the Upper West Region of Ghana, measured using ¹⁵N natural abundance. *Symbiosis*, 48, pp. 37 – 46
- Pule-Meulenberg, F., A. K. Belane, T. Krasova-Wadeand & F. D. Dakora, 2010.** Symbiotic functioning and bradyrhizobial biodiversity of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in Africa. *BMC Microbiology*, 10, p. 89.
- Sarr, P.S., T. Yamakawa, S. Fujimoto, Y. Saeki, H.T. Thao & A.K. Myint, 2009.** Phylogenetic diversity and symbiotic effectiveness of root-nodulating bacteria associated with cowpea in the South-West area of Japan. *Microbes Environ*, 24, pp.105 - 112
- Silva, Junior E.B., K. da Silva, S.S.Oliveira & G.R. Xavie, 2014.** Cowpea nodulation and production in response to inoculation with different rhizobia densities, *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 49 (10), pp. 804 - 812. (P).
- Stoilova, T., 2012.** Cowpea (*Vigna unguiculata* L.). *Zemedelie Plus*, 4, pp. 14 - 15 (Bg).
- Thiagarajan, T. R., R. N. Ames & M. H. Ahmad, 1992.** Response of cowpea (*Vigna unguiculata*) to inoculation with co-selected vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* strains in field trials, *Canadian Journal of Microbiology*, 38 (6), pp. 573 - 576
- Trotman, A.A. & R.W.Weaver, 1985.** Number and effectiveness of cowpea rhizobia in soils of Guyana, *Trop. Agric*, 63 (2), pp. 129 - 132
- Walp, L. & M. F. Salem, 2013.** Effect of microbial inoculation on reduction of cowpea (*Vigna unguiculata*) L. Walp) chemical fertilizers under newly reclaimed soils condition in Egypt . *J. Plant Production, Mansoura Univ.*, 4 (5), pp. 745 – 761