



**UMCS**

**UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ  
W LUBLINIE**

**Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych**

Dziedzina: **nauk rolniczych**

Dyscyplina: **rolnictwo i ogrodnictwo**

**Imię Nazwisko: Karolina Smytkiewicz-Buzak**

nr albumu: 299691

**Wpływ czynników Nod i molibdenu na  
usprawnienie procesu symbiotycznego wiązania  
azotu i plonowanie grochu siewnego w  
zróżnicowanych warunkach wilgotności gleby**

**(Influence of Nod factors and molybdenum on the  
improvement of symbiotic nitrogen fixation and yield of  
pea under various soil moisture conditions)**

Rozprawa doktorska przygotowywana pod kierunkiem naukowym  
prof. dr hab. Janusza Podleśnego

w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa –  
Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach

LUBLIN, 2023

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania:*

*Panu prof. dr hab. Januszowi Podleśnemu za nieocenioną pomoc,  
wszelkie rady i wskazówki udzielone mi podczas pisania tej pracy  
oraz ogromne wsparcie, zaangażowanie i nieustanną motywację.*

*\*\*\**

*Pragnę podziękować też wszystkim pracownikom Zakładu Uprawy  
Roślin Pastewnych za pomoc w realizacji tej pracy oraz życzliwość.*

*\*\*\**

*Serdecznie dziękuję mojej rodzinie:  
mężowi, rodzicom, siostrze i dziadkom,  
za wsparcie oraz nieocenioną motywację.*

*Bardzo dziękuję!*

## Spis treści

1. WSTĘP I CEL BADAŃ .....	5
2. PRZEGLĄD LITERATURY .....	9
2.1. Charakterystyka i znaczenie grochu siewnego .....	9
2.2. Rola azotu w kształtowaniu wielkości i jakości plonu roślin uprawnych .....	11
2.3. Nawożenie grochu siewnego makro- i mikroelementami .....	14
2.4. Opis procesu symbiotycznego wiązania azotu .....	18
2.5. Znaczenie molibdenu w procesie redukcji azotu cząsteczkowego .....	23
2.6. Charakterystyka czynników ograniczających efektywność procesu biologicznej redukcji azotu atmosferycznego .....	26
2.7. Metody poprawy efektywności symbiozy między rizobiami a rośliną gospodarzem ..	29
2.8. Rola czynników Nod i innych cząstek sygnałnych w procesie biologicznej redukcji azotu atmosferycznego .....	31
3. METODYKA BADAŃ .....	33
3.1. Warunki prowadzenia badań .....	33
3.2. Czynniki doświadczenia .....	35
3.3. Obserwacje i pomiary .....	36
3.3.1. Ocena wschodów roślin .....	37
3.3.2. Pomiary biometryczne roślin .....	37
3.3.3. Określenie dynamiki przyrostu masy .....	37
3.3.4. Liczba i masa brodawek korzeniowych .....	38
3.3.5. Pomiar parametrów wymiany gazowej .....	38
3.3.6. Pomiar fluorescencji chlorofilu .....	39
3.3.7. Pomiar indeksu zieloności liścia .....	39
3.3.8. Pomiar powierzchni liściowej .....	40
3.3.9. Pomiar korzeni .....	41
3.3.10. Określenie plonu i cech jego struktury .....	41
3.4. Obliczenia statystyczne .....	42

4. WYNIKI .....	44
4.1. Określenie potrzeb wodnych grochu siewnego .....	44
4.2. Dynamika wschodów roślin.....	46
4.3. Wysokość roślin.....	47
4.4. Długość łodygi ze strąkami.....	49
4.5. Liczba liści .....	50
4.6. Dynamika przyrostu suchej masy .....	52
4.7. Liczba i masa brodawek korzeniowych.....	53
4.8. Parametry wymiany gazowej.....	57
4.9. Wskaźniki fluorescencji chlorofilu .....	60
4.10. Indeks zieloności liścia .....	61
4.11. Powierzchnia liści .....	62
4.12. Parametry korzeni .....	63
4.13. Plon nasion i elementy jego struktury.....	67
4.14. Skład chemiczny nasion.....	71
5. DYSKUSJA.....	74
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	84
7. LITERATURA.....	86
Streszczenie/Summary .....	106

## 1. WSTĘP I CEL BADAŃ

Rośliny należące do rodziny bobowatych (*Fabaceae* Lindl.) (dawniej motylkowate – *Papilionaceae* Hall.) to cenne gatunki pełniące istotną rolę w rolnictwie oraz wielu gałęziach przemysłu (Kotecki i Kozak 2020). Zalicza się je do klasy dwuliściennych (*Dicotyledoneae*), podklasy różowych (*Rosidae*), rzędu bobowców (*Fabales*) oraz rodziny bobowatych dzielących się na kolejne 3 podrodziny (Podleśna 2018, Kotecki i Kozak 2020). Rośliny te występują we wszystkich strefach klimatycznych, zarówno jako komponenty mokrych lasów tropikalnych, zbiorowisk leśnych oraz regionów pustynnych i arktycznych. Do rodziny bobowatych zalicza się około 20 000 gatunków i aż 750 rodzajów. Bobowate ze względu na masę 1000 nasion dzielą się na: bobowate grubonasienne (strączkowe), których masa nasion przekracza 15 g (m.in. groch siewny, łubin, soja, bobik) oraz drobnonasienne o masie niższej niż 15 g (m.in. koniczyna, lucerna, esparceta); (Kotecki i Kozak 2020).

Nasiona bobowatych grubonasiennych charakteryzują się wysoką zawartością dobrego jakościowo białka, bogatego w aminokwas lizynę oraz składników mineralnych i witamin z grupy B. Wysokobiałkowe są również części nadziemne tych roślin. Dlatego też rośliny strączkowe są cennym źródłem pokarmu zarówno dla ludzi jak i zwierząt hodowlanych (Matyka i in. 1985, Kotecki i Kozak 2020). Ponadto rośliny strączkowe mają duże znaczenie w płodozmianie. Ich uprawa wzbogaca glebę w przyswajalny azot pochodzący z procesu symbiozy z bakteriami brodawkowymi. Pierwiastek ten pozostaje w znacznych ilościach w resztkach poźniwnych i jest wykorzystywany przez rośliny następcze co ma szczególne znaczenie w przypadku integrowanego i ekologicznego systemu produkcji roślinnej (Vance 1998). Współzycie roślin bobowatych z mikrosymbiontami ma również znaczenie ekonomiczne w związku z wysokimi i ciągle rosnącymi cenami nawozów azotowych. Ponadto wykorzystanie przez roślinę azotu związanego symbiotycznie podczas procesu biologicznej redukcji azotu atmosferycznego jest dwukrotnie wyższe niż dostarczonego w postaci nawozu mineralnego. Rodzime gatunki roślin strączkowych są bardzo dobrym przedplonem, ich uprawa pozwala ograniczyć nawożenie mineralne nawet o 20-25% (Prusiński i Kotecki 2006). Obecność bobowatych w płodozmianie wpływa również na zwiększenie w glebie zawartości próchnicy oraz makro- i mikroelementów (Kotecki i Kozak 2020). Rozbudowany, mocny, palowy system korzeniowy tych roślin ułatwia im pobieranie niezbędnych pierwiastków (głównie fosforu i potasu) z głębszych warstw gleby. Ponadto wody opadowe dzięki rozluźnieniu gleby przez głęboki system korzeniowy łatwiej

przenikają w głąb profilu glebowego, co znacznie ogranicza erozję wodną (Voisin i in. 2014).

Pomimo bardzo wielu zalet roślin strączkowych ich powierzchnia zasiewów w Polsce jest wciąż zbyt mała. Przyczyną tego są niskie i zmienne w latach plony nasion (Podleśny i Podleśna 2014). Wysokość plonu bobowatych grubonasiennych zależy od wielu czynników środowiskowych, agrotechnicznych i biologicznych (Strzelec 1988, Stasiak i in. 2016, Kulig i in. 2021). Rośliny te są szczególnie wrażliwe na niedobór wody (Podleśny i Podleśna 2011). Duży wpływ na ich plonowanie ma również typ gleby i jej zasobność w składniki pokarmowe, a także temperatura powietrza, stosowany płodozmian, nawożenie oraz odporność odmian na choroby i szkodniki (Strzelec 1988, Stasiak i in. 2016). Małe zainteresowanie rolników uprawą roślin strączkowych wynika również z wysokich kosztów materiału siewnego (Kotecki i Kozak 2020). Dlatego też producenci nasion często uprawiają słabo plonujące, stare odmiany roślin. Utrudnienia w uprawie roślin strączkowych, ich niskie i zmienne plony oraz błędy agrotechniczne popełniane przez rolników powodują, że potencjał plonotwórczy roślin bobowatych jest słabo wykorzystywany we współczesnym rolnictwie (Podleśny i Podleśna 2014).

W Polsce dąży się do zwiększenia produkcji rodzimych surowców białkowych, które mogłyby zastąpić bądź uzupełnić produkty importowane. W naszym kraju są nimi obecnie głównie nasiona roślin strączkowych i śruta rzepakowa oraz w mniejszych ilościach mączka rybna. Jednak te komponenty w małym stopniu pokrywają krajowe potrzeby przemysłu paszowego, dlatego też występuje bardzo duży ich deficyt, który uzupełniany jest głównie przez import bardzo drogiej poekstrakcyjnej śruty sojowej (<https://www.idhsustainabletrade.com/uploaded/2021/06/2019-IDH-European-Soy-Monitor-report.pdf>), pokrywającej około 80% rocznych potrzeb krajowych. Dodatkowo aż 90% importowanych surowców pochodzi z odmian genetycznie modyfikowanych (GMO - ang. *Genetically Modified Organism*). Tymczasem rodzime, roślinne surowce białkowe są wolne od GMO. Istotne jest zatem dążenie do zwiększenia powierzchni uprawy roślin strączkowych w Polsce, w celu zapewnienia tzw. bezpieczeństwa białkowego. W celu odnowy rynku krajowych surowców białkowych Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi realizowało w latach 2011-2015 Program Wieloletni pt. „Ulepszanie krajowych źródeł białka roślinnego, ich produkcji, systemu obrotu i wykorzystania w paszach” (Uchwała Rady Ministrów nr 149/2011), kontynuowany w latach 2016-2020 pt. „Zwiększenie wykorzystania krajowego białka paszowego dla produkcji wysokiej jakości produktów zwierzęcych w warunkach zrównoważonego rozwoju” (Uchwała Rady Ministrów nr

222/2015). Zakaz stosowania pasz GMO miał wejść w życie od dnia 12 sierpnia 2008 r., ale termin ten był kilka razy przesuwany i ostatecznie został ustalony na dzień 1 stycznia 2025 roku. Jednak w obecnej sytuacji wydaje się to mało realne, ze względu na brak możliwości zastąpienia dużej ilości importowanej poekstrakcyjnej śrutu sojowej innymi surowcami do produkcji pasz białkowych w Polsce.

### **Hipoteza badawcza**

W hipotezie badawczej założono, że znacznym ograniczeniem w procesie biologicznej redukcji azotu atmosferycznego przez groch siewny jest niedostateczne stężenie związków sygnałnych, które wymieniane są w dialogu molekularnym pomiędzy gospodarzem roślinnym a bakteriami z rodzaju *Rhizobium*. Cząstki sygnałne często dyfundują lub ulegają degradacji, a niesprzyjające warunki klimatyczno-glebowe, szczególnie niedobór wody w glebie dodatkowo nasila ten efekt. Założono, że zastosowanie preparatu zawierającego czynniki Nod w postaci zaprawy nasiennej zwiększy efektywność symbiozy przyczyniając się do lepszego zaopatrzenia roślin grochu w azot i tym samym otrzymania wyższego i lepszego jakościowo plonu nasion. Dodatkowo założono, że preparat zawierający molibden przyczyni się do usprawnienia działania enzymu nitrogenazy, co korzystnie wpłynie na efektywność biologicznej redukcji azotu atmosferycznego.

### **Celem głównym rozprawy doktorskiej było:**

1. Ocena możliwości zwiększenia plonowania grochu siewnego poprzez polepszenie procesu symbiotycznego wiązania azotu, w wyniku stosowania: a) innowacyjnego preparatu zawierającego czynniki Nod oraz b) molibdenu.
2. Określenie możliwości zmniejszenia niekorzystnego wpływu warunków stresowych (stres suszy) na przebieg procesu symbiozy grochu z bakteriami brodawkowymi w wyniku zastosowania wyżej wymienionych preparatów.

### **Cele szczegółowe to:**

1. Polepszenie dynamiki i równomierności wschodów roślin poprzez stosowanie preparatu zawierającego rizobialne czynniki Nod oraz molibdenu.
2. Poprawa wskaźników morfologicznych i fizjologicznych roślin grochu poprzez zastosowanie wyżej wymienionych preparatów.

3. Zwiększenie liczby oraz masy brodawek korzeniowych i tym samym usprawnienie procesu symbiotycznego wiązania azotu.
4. Ocena wpływu uwzględnionych w badaniach preparatów na elementy struktury plonu oraz zwiększenie poziomu plonowania roślin grochu.
5. Ograniczenie niekorzystnego wpływu suszy na wzrost, rozwój, plonowanie oraz biologiczną redukcję azotu atmosferycznego poprzez zastosowanie preparatu czynników Nod i molibdenu.

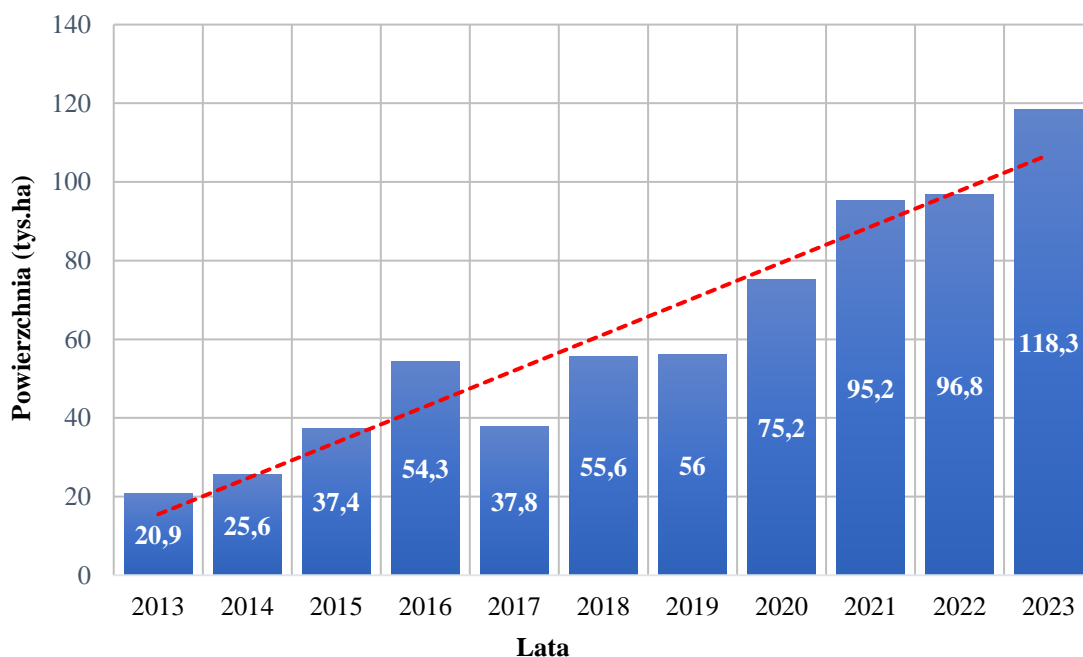


## 2. PRZEGLĄD LITERATURY

### 2.1. Charakterystyka i znaczenie grochu siewnego

Groch siewny (*Pisum sativum* L.) jest cenną rośliną strączkową należącą do rodziny bobowatych. Gatunek ten od dawna jest znany w Polsce, ale na większą skalę został wprowadzony do uprawy dopiero po I wojnie światowej (Kotecki i Kozak 2020). Gatunek obejmuje różne formy morfologiczne: ulistnione i wąsolistne, krótko- i długołodygowe (Szczygielski 1993). Groch siewny jest jednym z ważniejszych gatunków roślin strączkowych o dużej przydatności do uprawy w naszej strefie klimatycznej; wykorzystywany jest m.in. na cele jadalne, paszę, suche nasiona oraz zielonkę (Szwejkowska 2006, Stasiak i in. 2016). W Krajowym Rejestrze Odmian Roślin Uprawnych w 2022 r. wpisanych było 29 odmian grochu siewnego, z czego 20 stanowiły odmiany ogólnoużytkowe, a 9 to odmiany pastewne (COBORU 2022).

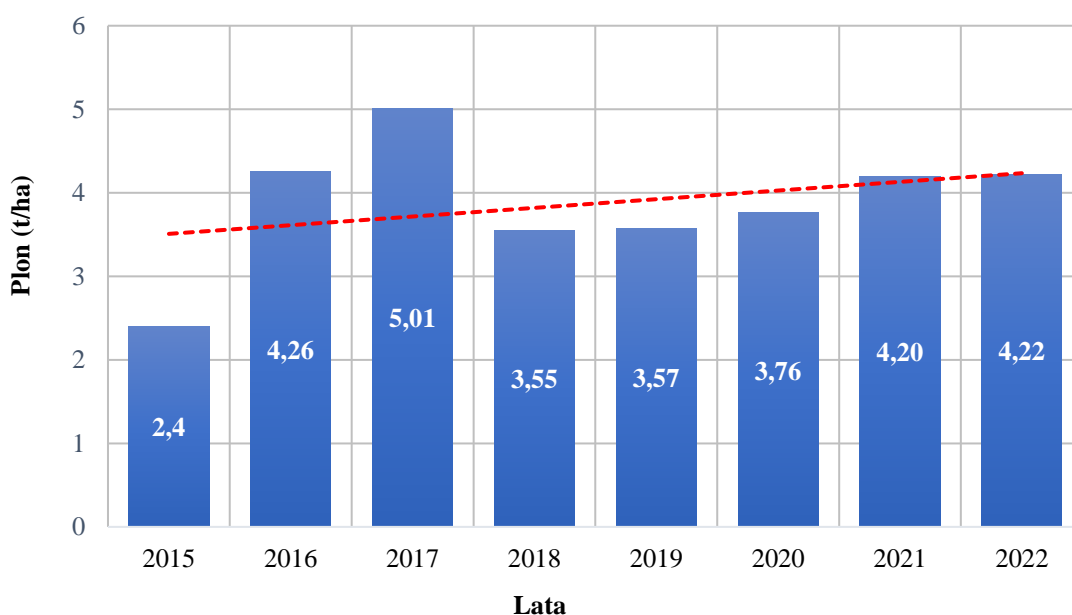
Przeważająca wielkość światowej produkcji grochu siewnego (55%) przypada na Kanadę, Rosję oraz Chiny (Kotecki i Kozak 2020). W Polsce powierzchnia zasiewów grochu w latach 2000-2014 była stosunkowo niewielka i wahała się od około 10 do 20 tys. ha. Znaczące zwiększenie powierzchni uprawy tego gatunku odnotowuje się dopiero od 2015 roku (rys.1). Duży przyrost powierzchni uprawy roślin strączkowych był spowodowany wprowadzeniem od 2015 roku dopłaty specjalnej do uprawy roślin bobowatych, w tym także grochu siewnego. W efekcie w roku 2019 powierzchnia uprawy grochu wynosiła już 56 tys. ha (GUS 2020). Według danych Agencji Restrukturyzacji i Modernizacji Rolnictwa (ARiMR) uzyskanych z wniosków o przyznanie płatności bezpośrednich powierzchnia uprawy grochu siewnego w Polsce w 2023 roku wynosiła 118 370 ha (<https://rejestrupraw.arimr.gov.pl>). W porównaniu z 2015 rokiem powierzchnia uprawy grochu wzrosła aż o 68,4% i o 18,2% w porównaniu do roku poprzedniego (2022). Dopłaty do uprawy roślin strączkowych pokrywają w ponad 60% koszty ponoszone przez rolników (Czerwińska-Kayzer 2015). Jednak powierzchnia ich uprawy, w tym także grochu siewnego jest ciągle niezbyt duża (Podleśny i Bieniaszewski 2012). W związku z tym prowadzone są liczne badania mające na celu poszukiwanie skutecznych metod polepszenia plonowania tego gatunku (Podleśny i in. 2017, Smytkiewicz i in. 2021), w celu zwiększenia opłacalności i powierzchni jego uprawy.



Rys.1. Powierzchnia uprawy grochu w Polsce w latach 2013-2023 (GUS 2014-2019; <https://rejestrpraw.arimr.gov.pl>) \*czerwona przerywana linia - linia trendu)

Groch siewny to gatunek o dużych walorach konsumpcyjnych i paszowych. Nasiona grochu są cennym źródłem dobrego jakościowo białka, którego zawartość wynosi od 180 do 230 g/kg. W składzie aminokwasowym przeważają globuliny, które stanowią 66%, następnie albuminy (21%) i gluteiny (12%). Wysoką wartość pokarmową ma również zielona masa, w której zawartość białka wynosi średnio od 170 do 190 g/kg przy zawartości włókna znajdującego się w przedziale od 260 do 300 g/kg (Kotecki i Kozak 2020). Posiada on również znaczny potencjał plonotwórczy, który nie jest w wystarczającym stopniu wykorzystawany w produkcji roślinnej (Dragańska i in. 2005).

Plony nasion grochu w Polsce zależą między innymi od rozkładu i ilości opadów atmosferycznych, dlatego też są zmienne i bardzo niestabilne na przestrzeni lat (rys.2). W 2022 roku średni plon nasion grochu wyniósł w naszym kraju 4,22 t/ha i był o 43,1% wyższy od plonu uzyskanego w 2015 w roku. Czynnikiem ograniczającym plonowanie grochu jest między innymi niekorzystny przebieg warunków pogodowych, w tym zwłaszcza niedobór opadów w okresie kwitnienia i zawiązywania strąków (Podleśny i Podleśna 2010). Gatunek ten ma umiarkowane wymagania wodne, a jego zapotrzebowanie na wodę jest różne w zależności od fazy rozwojowej. Optymalna całkowita ilość opadów w okresie wegetacji grochu powinna wynosić około 220 mm. Duże potrzeby wodne, ze względu na wielkość nasion ma groch siewny w okresie kiełkowania.



Rys.2. Plon nasion grochu w Polsce w latach 2015-2022 (COBORU 2016-2023);  
\*czerwona przerywana linia - linia trendu)

Kielkujące nasiona grochu pobierają w okresie wschodów duże ilości wody, wynoszące od 67 do 125% ich całkowitej masy. Deficyt wody w tzw. okresach krytycznych dla grochu przyczynia się do zrzucania kwiatów i strąków. Z kolei nadmiar opadów w okresie dojrzewania nasion jest przyczyną przedłużenia okresu wegetacji i utrudniania procesu zbioru (Kotecki i Kozak 2020), a niekiedy także zwiększonego porażenia nasion przez patogeny chorobotwórcze (Dragańska i in. 2005).

## 2.2. Rola azotu w kształtowaniu wielkości i jakości plonu roślin uprawnych

Azot (N) jest szeroko rozpowszechnionym w środowisku, niezbędnym pierwiastkiem biogennym, który w największym stopniu wpływa na plonowanie roślin (Greenwood 1982, Starzyk i in. 2013, Trawczyński 2013). Jest istotnym składnikiem tworzącym każdą żywą komórkę, ponieważ wchodzi w skład kluczowych makrocząsteczek, tj. białek i peptydów, kwasów nukleinowych (DNA i RNA), nukleotydów, chlorofilu, witamin, hormonów roślinnych, a także metabolitów wtórnych (alkaloidy, betalainy, olejki gorczyczne, glikozydy cyjanogenne) oraz nośników energii (ATP, GTP). Jest zatem cennym składnikiem mineralnym biorącym udział prawie we wszystkich procesach zachodzących w komórkach roślinnych (Adamczyk i Godlewski 2010, Staszewski 2011). Dlatego też biorąc pod uwagę makroelementy zapotrzebowanie roślin na azot jest największe (Kraiser i in. 2011). Jego

wszechstronny i niezastępowalny udział w metabolizmie warunkuje prawidłowy wzrost i rozwój organizmów wyższych (Andrews i Lea 2013).

Ilość azotu w środowisku ziemskim szacowana jest na około  $1,6 \cdot 10^{17}$  t. Pierwiastek ten występuje głównie w atmosferze (ok.  $3,86 \cdot 10^{15}$  t), litosferze (ok.  $1,64 \cdot 10^{15}$  t) i biosferze ( $2,8 \cdot 10^{11}$  t) w różnych stopniach utlenienia (od -III do +V); (Błaszczuk 2010, Martinez-Espinosa i in. 2011, Podleśna 2018). Zdecydowana większość azotu (98%) występuje w formie nieorganicznej (poza organizmami żywymi), a zaledwie 2% całkowitej ilości tego pierwiastka stanowi postać biotyczna, tj. obecna w organizmach żywych i ich biocenozach (Wielbo i Skorupska 2003). Azot w postaci gazowej ( $N_2$ ) jest niereaktywny i nieprzyswajalny przez większość organizmów wyższych. Cząsteczka tego pierwiastka jest wyjątkowo trwała, ponieważ pomiędzy atomami azotu występuje odporne na atak chemiczny potrójne wiązanie kowalencyjne (Oldroyd i Dixon 2014). Do jego rozerwania niezbędna jest zatem duża ilość energii (ok. 941 kJ). Francuski chemik Lavoiser formę gazową  $N_2$  określił mianem „azot” co oznacza „bez życia” (Stryer i in. 2009, Łyszcz i Gałązka 2016). Nieprzyswajalna przez organizmy wyższe forma azotu  $N_2$  stanowi około 78% składu atmosfery. Do rezerwuarów biodostępnych należy również gleba, w której pierwiastek występuje w postaci związków organicznych i nieorganicznych (azotany –  $NO_3$ , azotyny –  $NO_2$  i jony amonowe –  $NH_4$ ); (Krug i Winstanley 2002, Wielbo i Skorupska 2003, Oleńska 2015). Jednak często w glebach uprawnych stwierdza się niedobór tego pierwiastka co przyczynia się m.in. do obniżenia wielkości i jakości plonów (Łyszcz i Gałązka 2016). W polskich glebach zawartość N nie przekracza 1 g N/kg gleby (Fotyma i in. 1998), a na jego stężenie w roztworze glebowym duży wpływ ma odczyn, natlenienie, temperatura oraz źródło węgla. Dodatkowo korzenie roślin pobierają jedynie niewielkie rozpuszczone w nim cząsteczki azotu. Do wzrostu i rozwoju roślin niezbędne są głównie mineralne formy tego pierwiastka (Dechorgnat i in. 2011). Braki azotu w glebach uprawnych uzupełnia się stosując nawozy mineralne, które w 60-70% pokrywają zapotrzebowanie roślin na ten makroelement i są największym źródłem przyswajalnej przez rośliny formy tego pierwiastka. Produkcja nawozów azotowych na świecie wynosiła w ostatnich latach około 90 mln ton (Fowler i in. 2013, Vitousek i in. 2013). Światowe zużycie nawozów, liczone w skali roku, zwiększyło się prawie 9-krotnie w ciągu ostatnich 50 lat (McAllister i in. 2012). Nawożenie mineralne jest kosztowną metodą uzupełniającą braki azotu, która wymaga dużych nakładów energii oraz negatywnie wpływa na środowisko. Dodatkowo do 60% azotu stosowanego w nawozach ulega stratom m.in. przez wymywanie do wód bądź też uwalnianie do atmosfery. Przyczynia się to do zanieczyszczenia środowiska powodując eutrofizację

okolicznych zbiorników wodnych i zakwaszanie gleb (McAllister i in. 2012, Nogalska 2013, Rogers i Oldroyd 2014). Niezrównoważone gospodarowanie nawozami mineralnymi powoduje także wzrost gazów cieplarnianych oraz kumulację pozostałości nawozów w żywności (Sun i in. 2017). Zwiększanie ilości azotu w środowisku niesie za sobą długofalowe skutki, tj. zmniejszenie bioróżnorodności oraz przyspieszenie efektu cieplarnianego (Ellser i in. 2007, Good 2018).

Azot obecny w glebie ulega licznym przemianom z udziałem drobnoustrojów, tj. biologiczna redukcja  $N_2$ , nitryfikacja, denitryfikacja oraz mineralizacja i immobilizacja (Wielbo i Skorupska 2003). Jednym z ważniejszych procesów, będącym naturalnym źródłem N dla roślin jest biologiczne wiązanie azotu atmosferycznego, które przyczynia się m.in. do ograniczania ilości stosowanych nawozów mineralnych. Azot uzyskany w procesie symbiozy jest także bezpieczny dla środowiska oraz opłacalny pod względem ekonomicznym (Napora i in. 2015, Łyszcz i Gałązka 2016). Tę unikalną w świecie roślin możliwość współżycia z bakteriami brodawkowymi mają tylko rośliny bobowate i dzięki tej symbiozie są zdolne do pokrycia swoich potrzeb pokarmowych względem azotu. Dlatego też nawożenie tym pierwiastkiem w ich uprawie jest ograniczone, zaleca się bowiem zupełny brak azotu w planie nawożenia lub stosowanie jedynie małej dawki przedsiewnej (startowej) w ilości od 20 do 30 kg N/ha. Pozwala to uzupełnić niedobory składnika w początkowym okresie wzrostu i rozwoju roślin kiedy proces biologicznej redukcji azotu cząsteczkowego nie został jeszcze rozpoczęty (Kocoń 1999).

Zawartość azotu w suchej masie organizmów wyższych wynosi od 0,1 do 6,0% (Bergmann 1997, Starck 2007) i w nawozach mineralnych występuje w formie azotanowej ( $NO_3^-$ ), amonowej ( $NH_4^+$ ) lub w formie amidowej (C-NH<sub>2</sub>) (w moczniku) (Gorlach i Mazur 2001, Kocoń 2014b). Rośliny uprawne na ogół pobierają azot z roztworu glebowego przez korzenie, ale mogą go również pobierać przez liście. Zarówno zbyt małe ilości N jak i nadmiar tego pierwiastka niekorzystnie wpływają na rośliny. Niedobór N silnie ogranicza ich wzrost i rozwój, powodując zarówno zmniejszenie wielkości jak i jakości plonu. Deficyt składnika przyczynia się do powstawania chlorozy liści, która doprowadza do żółknięcia blaszek oraz ich opadania. Często obserwuje się również słabe ukorzenie oraz mniejszą dynamikę wzrostu i rozwoju (Klama 2004, Starck 2007). Niedobór azotu decyduje o słabszym rozwoju powierzchni liściowej wpływając tym samym na intensywność fotosyntezy, która wpływa na ilość wytwarzanych asymilatów i przez to warunkuje wielkość plonu roślin. Pierwiastek ten jest łatwo reutilizowany, dlatego też żółknięcie starszych liści jest pierwszym objawem jego niedoboru (Gorlach i Mazur 2001, Kocoń 2014b). Z kolei

nadmiar azotu powoduje nadmierny wzrost roślin co przyczynia się do ich wylegania, a także zwiększa podatność na choroby i szkodniki (Staszewski 2011).

### **2.3. Nawożenie grochu siewnego makro- i mikroelementami**

Nawożenie roślin uprawnych (w tym roślin strączkowych) powinno opierać się na systemie zrównoważonym, w którym istotną rolę pełni bilans składników pokarmowych uwzględniających ich pobranie przez rośliny oraz dopływ tych pierwiastków z nawozów i innych źródeł (Jadczyżyn i in. 2008, Kocoń 2014a). Dokładną dawkę nawożenia na danym polu dostosowuje się do zaleceń nawozowych dotyczących potrzeb konkretnego gatunku rośliny uprawnej oraz do kompleksu rolniczej przydatności gleby. Ważnym etapem w doborze dawki jest również analiza chemiczna gleby pozwalająca na ocenę zawartości makro- i mikroelementów oraz wartości jej pH. Dla danego pola analizy te należy wykonywać raz na 3-4 lata (Jadczyżyn 2000). Jednak w wielu gospodarstwach nie wykonuje się takich analiz rutynowo lub wykonywane są one bardzo rzadko (Korsak-Adamowicz i in. 2012). Tymczasem groch ma duże wymagania zarówno pod względem zasobności składników pokarmowych jak i odczynu gleby (Kotecki i Kozak 2020).

Rośliny uprawne do prawidłowego wzrostu i rozwoju potrzebują różnych składników pokarmowych w odpowiednich dawkach i formach (Kocoń 2007). Optymalne zaopatrzenie w niezbędne pierwiastki jest istotne w wydaniu wysokiego i dobrego jakościowo plonu. Zapotrzebowanie na dany składnik zależy od gatunku rośliny. Na kuli ziemskiej odnotowano 92 naturalnie rozpowszechnione pierwiastki, z czego w roślinach pożytecznych, zbędnych lub toksycznych znajduje się ich 50. Istotne dla organizmu wyższego są tzw. składniki niezbędne, czyli takie bez których wzrost i rozwój byłby niemożliwy. W tej grupie znajduje się 17 pierwiastków, a ich niezbędność określają 3 główne kryteria (Starck 2007):

- przy braku składnika roślina nie może przejść pełnego cyklu rozwojowego,
- działanie składnika nie może być zastąpione przez żaden inny pierwiastek,
- pierwiastek musi brać bezpośredni udział w procesach metabolicznych rośliny jako część składowa metabolitu lub aktywator enzymów.

Omawiane składniki w zależności od zapotrzebowania organizmu dzielą się na makroelementy i mikroelementy (Starck 2007). Do grupy makroelementów należą: węgiel (C), wodór (H), tlen (O), azot (N), fosfor (P), potas (K), wapń (Ca), magnez (Mg) oraz siarka (S). Pierwiastki te w organizmach wyższych pełnią funkcję budulcową i są podstawą w żywieniu roślin. Ich zawartość w roślinach wynosi powyżej 0,1% suchej masy (Starck 2007,

Kocoń 2013, Kocoń 2014a). Pobierane są przez nie z gleby w dużych ilościach, od kilku do kilkuset kg/ha.

W nawożeniu roślin strączkowych istotną rolę pełnią fosfor (P) i potas (K) (Korsak-Adamowicz i in. 2012), a ich niedobór w glebie przyczynia się do ograniczania biologicznej redukcji azotu cząsteczkowego i tym samym zmniejszenia plonu nasion (Jasińska i Malarz 1983, Podleśny 2007). W porównaniu z łubinami (żółtym, wąskolistnym i białym) oraz bobikiem, groch siewny ma niższe zapotrzebowanie względem P i K, a średnie pobranie tych składników wynosi 13,5 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/t oraz 30,8 kg K<sub>2</sub>O/t plonu (Jadczyżyn 2000). Na glebach średnio zasobnych zalecana dawka fosforu i potasu dla grochu wynosi odpowiednio: od 20 do 50 kg/ha oraz od 45 do 105 kg/ha. W przypadku bardzo niskiej zawartości PK w glebie dawki nawozów mineralnych zwiększa się o 40-60 kg w stosunku do zalecanej. Przy bardzo wysokiej koncentracji tych pierwiastków w glebie dawki PK zmniejsza się średnio o 30-40 kg. Roślinom strączkowym nawozy fosforowo-potasowe podaje się w jednej dawce przedsięwzię, zazwyczaj jesienią lub wiosną w zależności od kategorii agronomicznej gleb (Kocoń 2014a). Niedobory obydwu tych pierwiastków, z powodu ich łatwej reutilizacji obserwuje się na starszych liściach (Bergmann 1997, Starck 2007).

Fosfor jest niezbędnym makroelementem w nawożeniu roślin strączkowych pełniącym wiele funkcji w organizmach żywych. Bierze udział w procesach katabolicznych i anabolicznych, przemianach energetycznych oraz reguluje aktywność enzymów. Pierwiastek ten jest nośnikiem energii w komórkach roślinnych, a także składnikiem kwasów nukleinowych, nukleotydów i koenzymów. Bierze udział w transporcie substancji organicznych oraz jonów nieorganicznych przez błonę komórkową. Wpływa także na rozwój brodawek na korzeniach roślin bobowatych (Bucher 2007). Niedobór fosforu w roślinach objawia się najczęściej zahamowaniem wzrostu oraz ciemnozielonymi liśćmi o fioletowopurpurowym zabarwieniu od dolnej strony. Zawartość składnika w suchej masie roślin znajduje się w przedziale od 0,04 do 1,0% s.m. i jest niższa w porównaniu z zawartością azotu, potasu czy wapnia. Rośliny pobierają ten pierwiastek w formie anionowej H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> i HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> i mogą go łatwo transportować ze starszych do młodszych organów (Bergmann 1997, Starck 2007).

Potas to jedyny pierwiastek z grupy makroelementów, który nie tworzy trwałych połączeń ze związkami organicznymi w organizmach żywych. Składnik ten jest pobierany w formie jednowartościowego jonu – kationu K<sup>+</sup>. Jego zawartość w suchej masie roślin waha się od 0,5 do 10,0%, a największe ilości tego pierwiastka zawierają młode liście, pędy wzrostu pędu i korzeni oraz organy spichrzowe. Potas pełni wiele funkcji w organizmach

żywych wpływając m.in. na gospodarowanie wodą czy aktywację enzymów biorących udział w procesach fotosyntezy i oddychania. Jest niezbędny w warunkach niedoboru wody biorąc udział w osmoregulacji komórek (Starck 2007). Pierwiastek ten pełni rolę osmolitu na glebach zasolonych, dlatego też w takich stanowiskach podtrzymuje biologiczną redukcję azotu atmosferycznego (Zahran 1999). Niedobór potasu objawia się głównie zahamowaniem wzrostu roślin, w szczególności ich organów spichrzowych. Na liściach pojawiają się plamy chlorotyczne i nekrotyczne, a łodyga staje się wiotka (Bergmann 1997, Starck 2007).

Ważnym pierwiastkiem w nawożeniu roślin strączkowych wpływającym na kształtowanie wielkości i jakości plonu nasion jest również magnez (Mg). Jednak zapotrzebowanie roślin na ten składnik nie jest tak duże jak w przypadku fosforu i potasu. Pobierany jest przez groch w ilości około 3,3 kg/t nasion, a jego średnia zawartość w suchej masie roślin wynosi od 0,5 do 0,8% (Starck 2007). Magnez jest składnikiem chlorofilu i aktywatorem wielu enzymów, z którymi tworzy wiązania jonowe np. między białkiem a ATP (Mazurczyk i Grześkiewicz 2001). Bierze udział w procesie fotosyntezy, a także w przemianach białek, węglowodanów oraz tłuszczów. Magnez wpływa na regulację równowagi jonowej pomiędzy jonami magnezu a jonami potasu i wapnia oraz sodu w roślinie. Niedobór składnika objawia się chlorozami liści, które przechodzą w nekrozy. Obserwowane są również plamy między żyłkami na blaszkach liściowych dolnych pięt (tzw. marmurkowatość liści). Na glebach o kwaśnym odczynie stosuje się wapno magnezowe, uzupełniając przy tym zarówno niedobory Ca jak i Mg. Przy optymalnym pH gleby zaleca się stosowanie siarczanu magnezu (Starck 2007).

Wapń (Ca) to istotny makroelement w nawożeniu roślin strączkowych, który dodatkowo wpływa na odczyn gleby. Jego niedobór powoduje spadek kolonizacji bakterii z grupy *Rhizobium*. Uczestniczy także w stabilizacji otoczki bakteryjnych heterocyst, które odpowiadają za aktywność enzymu katalizującego reakcję redukcji azotu cząsteczkowego w warunkach niedoboru tlenu (Wais i in. 2002). Wapń wchodzi w skład pektyn oraz ścian komórkowych, a także odpowiada za prawidłowy wzrost i rozwój korzeni. Jego zawartość w suchej masie roślin znajduje się w przedziale od 0,2 do 5,0%, przy czym rośliny dwuliścienne zawierają więcej Ca niż jednoliścienne. Pobierany jest przez rośliny w formie rozpuszczalnego jonu  $Ca^{2+}$ . Niedobór wapnia w dużym stopniu hamuje wzrost i rozwój roślin, powoduje obumieranie wierzchołków oraz deformację liści (Bergmann 1997, Starck 2007).

Istotną rolę w nawożeniu roślin strączkowych pełni również siarka (S). Ten makroelement jest niezbędnym pierwiastkiem w procesie symbiotycznego wiązania azotu i



syntezy białek (Kocoń 2014b). Zwiększa także efektywność wykorzystania przez rośliny azotu i innych składników pokarmowych (Podleśna i Cacak-Pietrzak 2006). Rośliny zawierają od 0,05 do 0,8% S w suchej masie i pobierają ten pierwiastek w formie jonu  $\text{SO}_4^{2-}$  głównie przez korzenie, a w mniejszych ilościach także przez powierzchnię liściową (aparaty szparkowe). Niedobór składnika objawia się najczęściej chlorozami młodych liści (Starck 2007). Powoduje również zahamowanie biologicznej redukcji azotu cząsteczkowego oraz przyczynia się do produkcji białka o zmniejszonej ilości aminokwasów egzogennych. Rośliny uprawne na stanowiskach ubogich w siarkę dobrze reagują na nawożenie dogłębne lub dolistne tym pierwiastkiem, wydając wyższe plony nasion oraz słomy (Bergmann 1997, Starck 2007).

Mikroelementy są niezbędne do wzrostu i rozwoju, a tym samym do wydania wysokiego oraz dobrego jakościowo plonu. Ich właściwości po raz pierwszy zostały opisane w latach 20. XX wieku (Kocoń 2010). Zawartość tych pierwiastków w roślinach jest 1000-krotnie mniejsza niż zawartość makroelementów, a ich pobranie wynosi od kilku gramów do 2 kg/ha (Kocoń 2014b). Głównym źródłem tych składników jest gleba, a jej pH wpływa na przyswajalność mikroelementów. Przewodność żelaza, manganu, miedzi oraz cynku zwiększa się wraz ze wzrostem zakwaszenia gleby, z kolei molibden wykazuje większą aktywność wraz ze wzrostem pH. W wielu glebach uprawnych odnotowuje się znaczne niedobory mikroelementów (Czuba 2000, Samoraj i in. 2014). W polskich glebach największy deficyt stanowią przyswajalne formy boru i miedzi (Lipiński 2013). Istotne jest zatem uzupełnianie niedoborów mikroelementów poprzez nawożenie dogłębne lub stosowanie oprysku (Kulig i Ziółek 1997). Dolistne nawożenie jest jednak efektywniejsze oraz bardziej ekonomiczne ze względu na mniejsze zużycie nawozów (tab.1).

Groch siewny podobnie jak inne rośliny bobowate grubonasienne ma wysokie wymagania w stosunku do mikroelementów szczególnie boru, molibdenu, manganu, cynku i kobaltu (Czuba 2000, Mazur i Mazur 2004, Sztuder 2009). Deficyt boru w glebie ogranicza kolonię bakterii *Rhizobium*, przyczyniając się także do ograniczenia tworzenia brodawek korzeniowych. Jego niedobór w środowisku glebowym sprawia, że tkanki przewodzące w brodawkach korzeniowych są nieprawidłowo zbudowane przez co dyfuzja asymilatów ulega znacznej redukcji (Weisany i in. 2013). Jego deficyt powoduje również nekrozę wierzchołków wzrostu pędu i korzeni oraz zamieranie kwiatów. Żelazo oraz molibden są komponentami enzymu nitrogenazy, katalizującego reakcję redukcji azotu cząsteczkowego (Sawicka 1997).

Tabela 1. Zalecana średnia dawka mikroelementów przy niskiej zasobności gleb (w przeliczeniu na formę pierwiastkową); (Stanisławska-Głubiak i Korzeniowska 2007)

Mikroelementy	Dawka dogłębowa (kg/ha)	Dawka dolistna (g/ha)
Bor (B)	2 - 3,5	200 - 400
Miedź (Cu)	6 - 10	300
Cynk (Zn)	8 - 12	600
Mangan (Mn)	-	1200
Molibden (Mo)	-	40 - 80

Deficyt żelaza przyczynia się do chlorozy młodych liści. Mangan z kolei bierze udział w procesie fotosyntezy oraz reakcjach utleniania i dekarboksylacji, a jego niedobór powoduje chlorozę, nekrozę oraz opadanie liści. Kobalt jest komponentem kobalaminy – witaminy B<sub>12</sub>. Związek ten bierze bezpośredni udział w biologicznej redukcji azotu cząsteczkowego, uczestnicząc w syntezie hemu leghemoglobiny (Kabata-Pendias i Pendias 1999, Kotecki i Kozak 2020). Niedobór cynku w środowisku glebowym powoduje zahamowanie wydłużania międzywęźli oraz przyczynia się do powstawania jasnozielonych przebarwień na starszych blaszkach liściowych (Bergmann 1997, Starck 2007).

Makro- i mikroelementy w uprawie roślin bobowatych pełnią ważną rolę w procesie symbiotycznego wiązania azotu atmosferycznego (Kudak 1994). Znajomość potrzeb pokarmowych roślin jest niezbędnym elementem w procesie zrównoważonego nawożenia. Odpowiednie zaopatrzenie roślin w niezbędne składniki pokarmowe przyczynia się do wydania wysokich i dobrych jakościowo plonów.

#### **2.4. Opis procesu symbiotycznego wiązania azotu**

Biologiczne wiązanie azotu (BNF – ang. *biological nitrogen fixation*) to jeden z ważniejszych procesów na ziemi, polegający na przekształceniu niereaktywnego i, tym samym, nieprzyswajalnego przez rośliny azotu cząsteczkowego (N<sub>2</sub>) w amoniak, czyli formę dostępną dla roślin (Hirsch 1992, Jensen i in. 2012). Mikrobiologiczna redukcja azotu atmosferycznego do jonów amonowych (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) to wysoce energetyczna transformacja, wymagająca siły redukcyjnej, czyli elektronów i protonów (H<sup>+</sup>), a także dużych ilości energii (ATP) (Martyniuk 2006).

Zdolność do przekształcania azotu cząsteczkowego mają tylko bakterie i archeony (Jensen i in. 2012). Drobnoustroje współżycząc z organizmem wyższym tworzą trzy rodzaje układów symbiotycznych (Martyniuk 2008):

- bakterie brodawkowe z roślinami strączkowymi,
- promieniowce z rodzaju *Frankia* z roślinami drzewiastymi,
- symbioza z cyjanobakteriami.

Dla rolnictwa największe znaczenie ma symbioza roślin strączkowych z bakteriami z rodzaju *Rhizobium*. Rośliny strączkowe tworzące układy symbiotyczne z bakteriami brodawkowymi dla swoich potrzeb pokarmowych mogą wykorzystywać i przekształcać nieprzyswajalny azot cząsteczkowy z atmosfery. Dzięki temu mogą rozwijać się na glebach ubogich w ten pierwiastek (Peoples i in. 2009). Charakterystyczną cechą biologicznego wiązania azotu jest wysoki poziom swoistości oddziaływania na wszystkich etapach interakcji bobowate-rizobia (Wang i wsp. 2012). Do nawiązania efektywnej symbiozy niezbędne są dwa zgodne biologicznie organizmy, których współżycie przynosi korzyści dla obydwu partnerów. Rolą mikroorganizmu zwanego *mikrosymbiontem* jest redukcja  $N_2$  oraz dostarczenie tkankom roślinnym aminokwasów i białek. Z kolei organizm wyższy (makrosymbiont) zapewnia bakteriom substancje energetyczne, w tym m.in. cukry (Kretowicz 1977, Mądrzak 1995, Denison i Kiers 2011). Biologiczne wiązanie azotu atmosferycznego przeprowadzane jest przez bakterie diazotroficzne (diazotrofy) (Mancinelli 1996), które są zróżnicowane zarówno pod względem fizjologicznym, morfologicznym jak i wymagań siedliskowych (Kennedy i Tchan 1992, Herridge i in. 2008, Jensen i in. 2012). Te drobnoustroje jak np. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* i *Mesorhizobium* mogą wiązać azot w procesie symbiozy (Bothe i in. 2010) z roślinami bobowatymi (Król i Zielewicz-Dudkowska 2005).

W agroekosystemach największe znaczenie ma symbioza roślin bobowatych z bakteriami brodawkowymi (rizobia) (Martyniuk 2012). Rizobia to grupa bakterii heterotroficznych o dużej plastyczności metabolicznej, pozwalającej na bytowanie w dwóch formach: saprofitycznej – w glebie oraz symbiotycznej – w brodawkach organizmu wyższego, tj. rośliny (Velázquez i in. 2010). Jednak w formie wolnożyjącej bakterie nie mogą wiązać azotu atmosferycznego, ponieważ do redukcji  $N_2$  potrzebują zgodnego genetycznie partnera (Sadowsky i Graham 1998, Graham i Vance 2003). Wieloetapowa symbioza pomiędzy tymi partnerami to ściśle kontrolowany, gatunkowo specyficzny i złożony proces. Poszczególne gatunki roślin mogą nawiązywać interakcje tylko z

określonymi gatunkami rizobiów (tab.2). Symbiontami grochu są szczepy *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, które mogą indukować brodawki również na korzeniach kilku innych gatunków roślin (Perret i in. 2000, Willems 2006). Badania naukowe wykazały, że dzikie gatunki roślin uprawnych mają więcej zgodnych symbiontów niż ich udomowione odpowiedniki (Mutch i Young 2004).

Tabela 2. Specyficzność oddziaływań ryzobiowych (Sujkowska 2009)

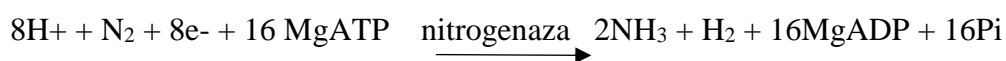
Rodzaj	Gatunek	Gospodarz roślinny
<i>Rhizobium</i>	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	wyka, groch, soczewica, lędźwian
	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	fasola
	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	koniczyna
	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>etli</i>	fasola, wspania
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i>	
	<i>B. elkani</i>	soja, wspania
<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. meliloti</i>	nostrzyk, lucerna, kozieradka
	<i>S. fredii</i>	soja, wspania
<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Mezorhizobium</i>	<i>M. loti</i>	komonica, łubin
	<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>

Podłoże genetyczne tego zjawiska przyczyniło się do zidentyfikowania metabolitów roślinnych i bakteryjnych, które uczestniczą w procesie symbiozy (Prithiviraj i in. 2003, Podleśny i in. 2014). Korzenie roślin pod wpływem czynników stresogennych (np. głód azotowy) wydzielają do ryzosfery duże ilości różnych substancji (Weston i Mathesius 2013), tj. flawonoidy, betainy, kwasy aldonowe, ksantony, proste związki fenolowe oraz kwas jasmonowy (Cooper 2007, Skorupska i in. 2010).

Brodawki korzeniowe są organem o złożonej strukturze anatomicznej i cytologicznej, których rolą jest przyswajanie azotu atmosferycznego (Hadri i in. 1998). Są one produkowane przez komórki wewnętrznej warstwy kory pierwotnej korzeni roślin bobowatych (Martniuk 2008). Występują na korzeniach organizmu wyższego i są zróżnicowane pod względem aktywności merystemu, kształtu oraz formy N transportowanego do roślin (Hadri i in. 1998). W związku z tym brodawki dzielą się na zdeterminowane (ograniczone), niezeterminowane (nieograniczone) oraz kołnierzykowate (Borucki 1998). Korzenie roślin grochu, lucerny, wyki oraz koniczyny posiadają brodawki

niezdeteminowane o wydłużonym kształcie cylindrycznym, których merystem jest zdolny do funkcjonowania przez cały okres wegetacyjny. Struktury te eksportują związany azot do pozostałych organów roślin w postaci amidów (Libbenga i Harkes 1973, Newcomb i in. 1979, Vance i in. 1987). Uwalniane do komórek roślinnych bakterie zostają otoczone błoną perybakteroidalną – PBM, tworząc tzw. symbiosomy. Błona ta pełni funkcję mechanicznej ochrony przed reakcją roślinnego gospodarza, a także służy do wymiany związków między partnerami. W symbiosomach dochodzi do różnicowania się komórek rizobiów, dzięki czemu powstają bakteroidy będące endosymbiotyczną formą zdolną do redukcji azotu cząsteczkowego (Vance i in. 1987).

W biologicznym wiązaniu N<sub>2</sub> istotną rolę odgrywa nitrogenaza, będąca enzymem katalizującym redukcję cząsteczki azotu (Philips 1980, Kamiński i in. 1998, Martyniuk i in. 2002). Sumarycznie reakcję tę przedstawia poniższe równanie: (Halbleib i Ludden 2000, Król i Zielewicz-Dudkowska 2005, Stryer i in. 2009, Martyniuk 2019):



gdzie:

ATP – adenosynotrifosforan; ADP – adenosynodifosforan; Pi – nieorganiczny fosforan

Kompleks enzymatyczny składa się z multimetrów, czyli dwóch białek żelazowo-siarkowych, zawierających w swoich centrach aktywnych metale. Białko molibdenowo-żelazowe (białko Mo-Fe, molibdoferredoksyna), będące komponentem I, zwane jest także dinitrogenazą, a w jej obrębie dochodzi do wiązania oraz redukcji azotu cząsteczkowego. U niektórych bakterii w kompleksie enzymatycznym występuje wanad zamiast molibdenu (np. *Azotobacter saliestris*) lub jedynie żelazo (np. *Clostridium pasteurianum*); (Wielbo i Skorupska 2003). Białko-MoFe to heterotetramer o masie cząsteczkowej 240 kDa, jest kodowany przez geny *nifD* i *nifK*. Powyższe procesy pozbawiają bakteroidy zdolności do podziałów, ale zyskują z kolei zdolność do wiązania N<sub>2</sub>. Istotną rolą organizmu wyższego jest zapewnienie bakteroidom zarówno warunków o niskim stężeniu tlenu (5-30 nMO) jak i stałego dopływu poprzez wiązki przewodzące węglowodanów, będących źródłem energii (White i in. 2007, Martyniuk 2008, Stasiak i in. 2016). W przeciwieństwie do wolno żyjących asymilatorów N<sub>2</sub> bakteroidy wiążą azot głównie dla organizmu rozwijającego się na glebie ubogiej w ten pierwiastek (White i in. 2007). Nitrogenaza zaczyna wykazywać się aktywnością po syntezie w komórkach roślinnych leghemoglobiny. Leghemoglobina jest białkiem o czerwonym zabarwieniu odpowiedzialnym za ochronę kompleksu nitrogenazy

przed nadmiarem tlenu ze środowiska zewnętrznego. Jednocześnie białko to bierze udział w dyfuzji tlenu do bakteroidów niezbędnego w procesach oddechowych. Zawartość leghemoglobiny w aktywnych brodawkach korzeni roślin bobowatych stanowi do 30% wszystkich rozpuszczalnych białek (White i in. 2007, Martyniuk 2008, Stasiak i in. 2016).

Proces biologicznej redukcji azotu atmosferycznego jest kontrolowany przez co najmniej 12 zidentyfikowanych, i wiele innych jeszcze niezidentyfikowanych, genów bakteryjnych (Kotecki i Kozak 2020). Ilość związanego N<sub>2</sub> zależy od gatunku gospodarza roślinnego i żyjącego z nim w symbiozie bakteryjnego szczepu oraz warunków środowiska (tab.3) (Mądrzak 1995).

Tabela 3. Porównanie wydajności redukcji N<sub>2</sub> prowadzonej przez bakterie symbiotyczne według różnych autorów (Mądrzak 1995)

Gatunek rośliny	Gatunek bakterii	Związany N <sub>2</sub> (kg/ha/rok)
Łubin ( <i>Lupinus</i> sp.)	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	20-200
Groch ( <i>Pisum sativum</i> L.)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	55-77
Bób ( <i>Vicia faba</i> L.)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	45-552
Soczewica ( <i>Lens esculenta</i> , <i>Lens culinaris</i> Medik.)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	88-114
Soja ( <i>Glycine max</i> (L.) Merr.)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	40-200
Fasola ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	40-70

Szacuje się, że dzięki procesowi biologicznego wiązania wolnego azotu z powietrza wiązane jest około 4 – krotnie więcej N<sub>2</sub> niż wynosi światowa produkcja nawozów azotowych (Król 2006). Proces ten dostarcza corocznie do gleb uprawnych około 139-170 mln ton azotu (Ishizuka 1992, Martyniuk 2012), a ilość pierwiastka związanego przez symbiozę rośliny z mikrosymbiontem stanowi od 60 do 80% tej ilości. Pozostałe 20-40% to azot związany przez bakterie niesymbiotyczne (Cheng 2008). Organizmy prokariotyczne wiążą znacznie mniej azotu (1-50 kg N/rok) niż mikroorganizmy pozostające w układach symbiotycznych (200-500 kg N/ha/rok); (Mądrzak 1995). W badaniach Wysokińskiego i in. (2014) (tab.4) z łubinem żółtym stwierdzono, że całkowita ilość pobranego przez roślinę azotu wynosi około 200 kg, z czego aż 65% to azot wiązany symbiotycznie. Duża część

azotu obecnego w roślinie gromadzona jest w nasionach. Wykazano także, iż roślina pobiera mało azotu z nawozu mineralnego, natomiast znacznie więcej z gleby, co potwierdza istotną rolę stanowiska w produkcji roślinnej. Biologiczne wiązanie azotu atmosferycznego przyczynia się do zwiększania plonu roślin bobowatych, wpływając również na poprawę struktury gleby i jej żyzności. Ma to szczególne znaczenie dla roślin następczych uprawianych w stanowiskach po roślinach strączkowych (Martyniuk 2008).

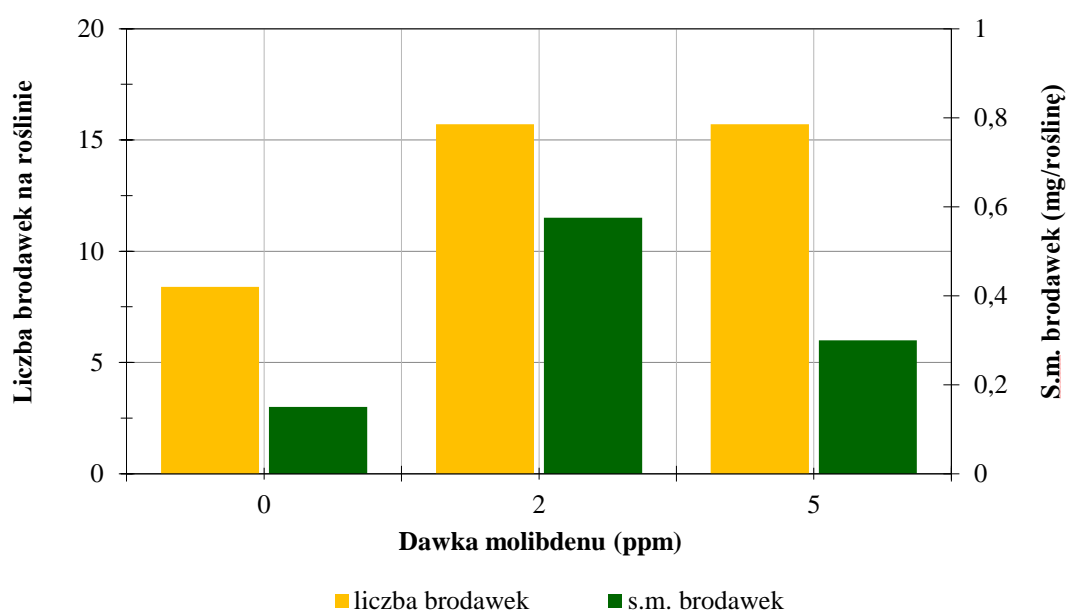
Tabela 4. Symbiotyczne wiązanie azotu przez łubin żółty (Wysokiński i in. 2014)

Źródła azotu	Jednostka	Część rośliny		Ogółem/średnio w roślinie
		resztki poźniwne	nasiona	
Całkowita ilość pobranego azotu	kg N·ha <sup>-1</sup>	75,3	137,8	213,1
	%	35,3	64,7	-
w tym:				
Atmosfera	kg N·ha <sup>-1</sup>	43,5	94,4	137,9
	%	57,8	68,5	64,7
Nawóz	kg N·ha <sup>-1</sup>	3,6	6,43	10,0
	%	4,8	4,7	4,7
Gleba	kg N·ha <sup>-1</sup>	28,2	37,0	65,2
	%	37,4	26,8	30,6

## 2.5. Znaczenie molibdenu w procesie redukcji azotu cząsteczkowego

Molibden (Mo) to jeden z ważniejszych pierwiastków w uprawie roślin bobowatych. Jest niezbędnym mikroelementem rozpowszechnionym w przyrodzie, który wpływa korzystnie na wzrost i rozwój roślin uprawnych. Jest komponentem reduktazy azotanowej przeprowadzającej redukcję azotanów do azotynów. Reguluje także przemiany azotu, fosforu i siarki w organizmach wyższych (Szukalski 1979, Williams i in. 2002). Molibden odgrywa także istotną rolę w procesie symbiotycznego wiązania azotu wchodząc w skład nitrogenazy. Przystawialne formy tego pierwiastka w glebie stymulują biologiczną redukcję azotu cząsteczkowego przez bakterie brodawkowe żyjące w symbiozie z organizmem wyższym (Rubio i Ludden 2008, Seefeldt i in. 2009), przyczyniając się do zwiększenia

liczby brodawek na korzeniach roślin (rys.3). Zdaniem Pejwe (1968) rola molibdenu w procesie redukcji N<sub>2</sub> polega na podnoszeniu aktywności enzymów flawoproteidowych oraz na udziale w enzymatycznej aktywacji molekularnego wodoru odpowiedzialnego za redukcję azotu. Będąc komponentem nitrogenazy molibden wpływa zarówno na wysokość jak i jakość plonów, powodując wzrost zawartości białka, witamin oraz chlorofilu (Pejwe 1968). Pomimo różnorodnych funkcji potrzeby pokarmowe roślin na ten składnik są małe i wynoszą od kilkudziesięciu do kilkuset gramów na hektar (Sójkowski 1971, Szukalski 1979).



Rys.3. Wpływ molibdenu na liczbę i suchą masę brodawek korzeniowych roślin soi (El-Hersch i in. 2011)

W Polsce duży udział gruntów ornych stanowią gleby o niskim odczynie a stan ten nie ulega poprawie od wielu lat, tj. od początku prowadzenia monitoringu żyzności gleb użytkowanych rolniczo (Ochal i in. 2017). W efekcie około 57% użytków rolnych wykazuje  $\text{pH}_{\text{KCl}} \leq 5,5$  (Smreczak i in. 2020). Tymczasem w stanowiskach o kwaśnym odczynie na ogół obserwuje się mało molibdenu. W glebach o niskim pH dochodzi często do ograniczenia wzrostu, rozwoju i plonowania większości gatunków roślin uprawnych. Zakwaszona gleba powoduje redukcję liczebności bakterii brodawkowych (*Rhizobium*) hamując ich aktywność (Kunhikrishnan i in. 2016). Bakterie bytujące w glebie wykazują aktywność w określonych zakresach odczynu gleby. Optymalny odczyn gleby dla rozwoju bakterii symbiotycznych grochu wynosi od 6,5 do 7,0. Z kolei dolna granica tolerancji pH znajduje się w przedziale 4,0-4,5 (Boguszewski i Kac-Kacas 1966). Wyniki badań dowiodły, że w próbkach gleb lekkich i zakwaszonych nie odnotowano bakterii symbiotycznych roślin bobowatych



(Martyniuk 2012). Molibden tworzy anionowe związki kompleksowe, które wykazują mobilność jedynie w glebie o odczynie obojętnym i zasadowym. W przypadku niskiego pH pierwiastek ten łączy się z tlenkami i wodorotlenkami glinu, manganu oraz żelaza, a także substancją organiczną i minerałami ilastymi co powoduje, że staje się niedostępny dla roślin (Piaseczna 2012). W stanowiskach o kwaśnym odczynie odnotowuje się natomiast duże stężenia jonów glinu, które mogą wpływać na zahamowanie wzrostu i rozwoju korzeni, włóśników, a także osłabić rozwój rizobiów i ostatecznie całej rośliny (Kotecki i Kozak 2020). W takich warunkach pobieranie molibdenu przez organizmy wyższe może być znacząco utrudnione. Zatem odczyn gleby w dużym stopniu wpływa na zawartość i pobieranie przyswajalnego dla roślin molibdenu (Piaseczna 2012). Groch siewny ma duże wymagania pod względem odczynu gleby, dlatego też istotne jest jej wapnowanie, najlepiej bezpośrednio po zbiorze przedplonu (Kotecki i Kozak 2020). Zabieg ten powinno się wykonywać jesienią, a w przypadku niskiej zasobności gleby w wapń zastosować nawet dawkę do  $6 \text{ t CaO} \cdot \text{ha}^{-1}$  (Jadczyzsyn i Ochal 2013).

Szacuje się, że w Polsce udział gleb z niedoborem molibdenu wynosi około 40%, w tym 17% stanowią niedobory ostre. Stanowiska z niską zawartością tego pierwiastka występują w środkowo-wschodniej Polsce, natomiast dobre zaopatrzenie w molibden odnotowuje się na terenach zurbanizowanych oraz uprzemysłowionych (Gembarzewski i Stanisławska 1987). Najbardziej ubogie w molibden są warstwy piasku luźnego (Czarnowska 1978). Najwięcej tego składnika zawierają mady, z kolei najmniej gleby płowe oraz czarne ziemie (Gorlach 1963, Stanisławska-Głubiak 2009). Źródłem małych ilości Mo w stanie rozproszonym są skały, gleby, woda oraz żywe organizmy. Zawartość tego składnika w skorupie ziemskiej wynosi od  $10^{-1}$  do  $10^{-2}$  % (Maksimow 1949). W glebach świata zawartość Mo mieści się w przedziale 0,1-7,0 mg/kg (Kabata-Pendias i Mukherjee 2007), a przeciętnie wynosi 1,2 mg/kg (Koljonen 1992). W polskich glebach całkowita zawartość tego pierwiastka znajduje się w przedziale 1-5 mg/kg (Kabata-Pendias 1996). Zawartość tego składnika w roślinach wynosi od 0,2 do 2,0 mg/kg suchej masy i różni się w zależności od gatunku oraz fazy rozwojowej rośliny (Stanisławska-Głubiak 2009). O dużym zapotrzebowaniu na molibden roślin wiążących symbiotycznie azot świadczy fakt, że w brodawkach korzeniowych jest go znacznie więcej niż w pozostałych częściach roślin (Seliga 1996). Niedobór molibdenu prowadzi do akumulacji azotanów, osłabienia wzrostu roślin i zahamowania syntezy białka (Kucharzewski i Dębowski 2000). U roślin rosnących w warunkach deficytu Mo obserwuje się trudności w wykształcaniu blaszek liściowych oraz pojawiające się na nich jasne plamy (Piaseczna 2012). Brak odpowiedniej ilości molibdenu

objawia się również chlorozą pojawiającą się między żyłkami młodych liści oraz na ich obrzeżach, a w konsekwencji zasychaniem roślin (Tisadale i in. 1985). W przypadku ostrego niedoboru Mo można zaobserwować obumieranie pąków oraz zamieranie stożków wzrostu (Piaseczna 2012). Groch siewny należy do roślin średnio wrażliwych na niedobór Mo (Katyal i Randhawa 1983). Przyjmuje się, że rośliny są odporne na nadmiar molibdenu, ale zbyt duża zawartość tego pierwiastka może przyczynić się do zahamowania wzrostu i rozwoju roślin, a w konsekwencji obniżki plonów (Szukalski 1979). Jednak nadmiar Mo w roślinach bobowatych jest niebezpieczny dla zwierząt przeżuujących, ponieważ za duża koncentracja tego składnika w paszy zakłóca przyswajanie miedzi prowadząc do jej niedoboru (Kruczyńska 1985). Należy dodać, że zwierzęta mają dość niskie zapotrzebowanie na molibden, które wynosi około 0,2 mg/kg i jest pokrywane przez ilości tego składnika naturalnie występujące w paszach (Korol i in. 2013).

Rośliny mogą pobierać molibden z gleby za pomocą dyfuzji lub przepływu z wodą. Pierwiastek ten przyswajają w formie sześciowartościowego anionu  $\text{MoO}_4^{2-}$  lub  $\text{HMoO}_4^-$  (Gorlach 1967). Nawożenie molibdenem zwiększa aktywność enzymu nitrogenazy podnosząc przy tym efektywność biologicznej redukcji azotu atmosferycznego i brodawkowania co przyczynia się do zwiększenia plonu nasion (Vieira i in. 1998; Weisany i in. 2013). Niedobory pierwiastka uzupełnia się przez nawożenie doglebowe, dolistne oraz donasienne (Stanisławska-Głubiak 2009). Doglebowo molibden stosowany jest tylko jednorazowo pod roślinę wykazującą zapotrzebowanie na ten składnik, a przez kolejne lata odnotowuje się jego działanie następcze (Faber 1992). Opryskiwanie roślin przynosi efekty tylko w jednym roku, ale pozwala na szybkie i precyzyjne uzupełnienie składnika. Preparat nie wchodzi w interakcję ze środkami ochrony roślin, więc można stosować go równocześnie ograniczając przy tym liczbę zabiegów agrotechnicznych (Mrówczyński i in. 2000). Dolistna, średnia dawka Mo zalecana przy niskiej zasobności gleby wynosi 40-60 g/ha (Stanisławska-Głubiak i Korzeniowska 2007, Jadczyzyn i in. 2008). Opryskiwanie roślin grochu molibdenem w fazie pąkowania oraz w fazie 5-6 liści wpływa na zwiększenie plonu nasion oraz na zawartość tego składnika w nasionach roślin (Kotecki 1990). Nawożenie molibdenem przyczynia się także do zwiększenia liczby brodawek korzeniowych oraz wzrostu ich suchej masy (El-Hersh 2011).

## **2.6. Charakterystyka czynników ograniczających efektywność procesu biologicznej redukcji azotu atmosferycznego**

Efektywny dialog pomiędzy gospodarzem roślinnym a mikrosymbiontem uzależniony jest od wymiany odpowiedniej ilości sygnałów molekularnych prowadzących do

wzajemnego rozpoznania się partnerów (Jones i in. 2007). Proces biologicznej redukcji azotu atmosferycznego zależy także od wielu czynników siedliskowych, do których zalicza się natężenie światła, intensywność fotosyntezy, pH, zasolenie oraz wilgotność gleby i zawartość w niej składników pokarmowych, a także pozostałości pestycydów. Na przebieg procesu redukcji azotu atmosferycznego wpływają również czynniki agrotechniczne, w tym m.in. gatunek i odmiana rośliny strączkowej, jej faza rozwojowa oraz gęstość siewu. Czynniki ograniczające proces symbiotycznego wiązania  $N_2$  mogą znacznie zmniejszyć wydajność symbiozy (Streeter 1994, Borowiecki 2004).

Gleba to miejsce bytowania licznych organizmów, na które wpływają czynniki biotyczne i abiotyczne kształtując jej bioróżnorodność i właściwości (Nannipieri i in. 2003). Jest również głównym źródłem składników pokarmowych dla rizobiów brodawkujących w fazie saprofitycznej. Dlatego też odpowiednie warunki klimatyczno-glebowe wpływają na przeżywalność zarówno bakteryjnych szczepów endogennych jak i tych wprowadzanych na drodze inokulacji (Golińska i Mądrzak 1999). Czynniki chemiczne (odczyn, zasobność w składniki pokarmowe), fizyczne (temperatura, wilgotność) i biologiczne gleby (skład zasiedlających ją organizmów) czyli tzw. czynniki edaficzne wpływają tym samym na rozwój i dłuższe funkcjonowanie brodawek roślin strączkowych, zwiększając przy tym aktywność nitrogenazy (Streeter 1994).

Fotosynteza jest jednym z najważniejszych procesów warunkujących wzrost i rozwój roślin, a tym samym również ich plonowanie. Jej wydajność zależy od wielu czynników zewnętrznych takich jak: natężenie światła, dostępność wody oraz odpowiedniego stężenia tlenu i dwutlenku węgla w atmosferze. Proces ten uzależniony jest również od czynników wewnętrznych, do których zalicza się m.in. powierzchnię liściową, zawartość chlorofilu oraz dostępność składników pokarmowych (Guan i in. 2015). Fotosynteza wraz z natężeniem światła należą do ważniejszych czynników wpływających na efektywność symbiozy (Mengel 1994). Intensywność tego procesu jest wprost proporcjonalna do aktywności enzymu nitrogenazy, a produkowane w czasie fotosyntezy związki organiczne (w tym węglowodany) stanowią źródło energii dla mikrosymbiontów (Starzyk i Swędryńska 2013). Przy optymalnym natężeniu procesu fotosyntezy wiązanie  $N_2$  nie jest ograniczone obecnością dostępnych asymilatów. Długookresowy wzrost stężenia dwutlenku węgla w atmosferze zwiększa w pierwszej kolejności intensywność fotosyntezy, a następnie intensywność redukcji acetylenu wynikającą ze wzrostu masy brodawek korzeniowych (Finn i Brun 1982, Williams i in. 1982). Optymalne warunki świetlne dla danego gatunku oraz długi dzień wpływają na odpowiednie zaopatrzenie brodawek korzeniowych w

produkty fotosyntezy, dzięki czemu proces wiązania  $N_2$  nocą nie ulega ograniczeniu (Williams i in. 1982).

Istotnym czynnikiem ograniczającym proces biologicznej redukcji azotu cząsteczkowego jest temperatura, która wpływa na trwałość rizobiów w glebach. W zależności od danego szczepu, optymalna temperatura może zwiększać biologiczną redukcję azotu atmosferycznego. Jednak zbyt wysokie lub zbyt niskie wartości tego wskaźnika ograniczają rozwój brodawek korzeniowych hamując przy tym intensywność redukcji  $N_2$  (Graham 1992). Wysoka temperatura może również przyczyniać się do rozwoju chorób (Kasper i in. 2019). Rośliny strączkowe mają różne wymagania względem temperatury gleby, jednak optymalne warunki dla większości diazotrofów to 15-30°C. Dla przykładu, optymalna temperatura sprzyjająca symbiozie roślin grochu i koniczyny wynosi 30°C, soi od 35 do 40°C, a fasoli od 25 do 30°C (Long 2001, Reynolds-Henne i in. 2010). Z kolei Reiter i in. (2002) wykazali, że optymalne warunki dla prawidłowej aktywności enzymu nitrogenazy znajdują się w przedziale 20-30°C.

Prawidłowy wzrost i rozwój bakterii symbiotycznych zapewnia obojętny odczyn gleby. W środowisku kwaśnym stwierdza się wysokie stężenie jonów wodorowych, które przyczynia się do zahamowania tworzenia brodawek korzeniowych oraz aktywności nitrogenazy (Mengel 1994). Spowodowane jest to wolniejszym tempem kolonizacji diazotrofów w środowisku glebowym i tym samym obniżeniem syntezy oraz sekrecji czynnika Nod (Zang i Smith 2002). W glebach o kwaśnym odczynie występują toksyczne dla roślin wysokie stężenia metali ciężkich (jony manganu i glinu). Jony glinu przyczyniają się do ograniczenia wzrostu korzeni i ich włosników, które są niezbędne dla przebiegu procesu symbiozy. Ponadto kwaśne gleby zawierają zbyt małe ilości niezbędnych, przyswajalnych przez rośliny pierwiastków takich jak wapń, magnez, fosfor i molibden, które mają istotne znaczenie w procesie redukcji  $N_2$  (Howieson i in. 1993).

Zasolenie gleby również wpływa na wiązanie azotu atmosferycznego. Zbyt wysoka ilość soli redukuje ilość wody w brodawkach prowadząc do ich przedwczesnego starzenia się, powodując destrukcję mechanizmu kontroli ciśnienia  $O_2$ , a także niszczenie włosników korzeniowych (Khailova i Lar'kova 1992).

Istotnym czynnikiem w procesie symbiozy jest również odpowiednie uwilgotnienie gleby. Optymalne warunki wodne poprawiają efektywność redukcji azotu, natomiast zbyt niska ilość wody przyczynia się do ograniczenia transportu produktów wytworzonych w czasie symbiozy, z brodawek do komórek roślinnych (Sawicka 1997).

Odpowiednia zawartość w glebie niezbędnych dla roślin pierwiastków wpływa nie tylko na ich prawidłowy wzrost i rozwój, ale wspomaga też biologiczną redukcję azotu atmosferycznego. Nawożenie makro- i mikroelementami jest istotnym czynnikiem poprawiającym wiązanie N<sub>2</sub> (Kudak 1994, Szpunar-Krok i Pawlak 2023).

Czynnikiem ograniczającym biologiczną redukcję azotu są substancje chemiczne wykorzystane w zaprawach nasiennych, które mogą powodować niższą przeżywalność bakterii na nasionach roślin (Martyniuk 2012). Nasilenie tego oddziaływania zależy od rodzaju wykorzystanej substancji oraz od gatunku zaszczepionej rośliny. Dodatkowo bakterie brodawkowe są wrażliwe na wysuszenie a ich przeżywalność na nasionach obniża się wraz z upływem czasu od zastosowania szczepionki (Martyniuk 2012).

Biologiczne wiązanie azotu atmosferycznego zależy także od występowania chorób i szkodników roślin, do których zalicza się m.in. oprzędziki. Ich larwy przyczyniają się do niszczenia brodawek korzeniowych, a duża populacja oprzędzika pręgowanego ogranicza pobieranie azotu, szczególnie w warunkach deficytu tego pierwiastka w glebie (Borowiecki i Księżak 2001, Borowiecki 2004).

## **2.7. Metody poprawy efektywności symbiozy między rizobiami a rośliną gospodarzem**

Działania mające na celu usprawnienie procesu symbiozy pomiędzy rośliną bobowatą a bakteriami symbiotycznymi mają działanie dwukierunkowe. Prowadzona inokulacja rizobiów w celu zwiększenia plonów roślin jest sprawdzoną technologią stosowaną już od ponad stu lat i należy do najstarszych metod agrobiotechnologicznych (Catroux i in. 2001, Bashan i in. 2014). W Polsce pierwsze próby stworzenia preparatu zawierającego namnożone hodowle szczepów podjęte były w 1920 roku w Poznaniu. Z kolei w roku 1954, z inicjatywy Zakładu Mikrobiologii IUNG-PIB w Puławach, powstała w Wąlczu Wytwórnia Szczepionek produkująca nitraginę dla roślin strączkowych (Strzelec 1988). Aby proces szczepienia roślin był produktywny potrzebny jest skuteczny i dobry jakościowo preparat. Jego właściwości zależą od liczebności oraz efektywności symbiotycznej wyselekcjonowanych szczepów bakterii. W procesie inokulacji pożądana jest również odpowiednia technika aplikacji szczepionki (Strzelec 1988, Martyniuk 2012, Pudelko i in. 2017).

Biopreparaty tego typu najczęściej stosowane są jako zaprawa nasenna (Martyniuk 2010, Pytlarz-Kozicka 2010). Jednak „sztucznie” wprowadzane bakterie są gorzej przystosowane do środowiska glebowego niż drobnoustroje naturalnie w nim bytujące, tzw. autochtony (Martyniuk i in. 1999b, Martyniuk i in. 2002). Wprowadzane żywe kultury

bakterii są bardziej wrażliwe na niekorzystne czynniki zewnętrzne i muszą konkurować ze szczepami autochtonicznymi co powoduje obniżenie skuteczności inokulacji. To oznacza, że wprowadzane do środowiska glebowego szczepy są skuteczne jedynie gdy nie napotykają silnej konkurencji ze strony bakterii bytujących już w glebie (Streeter 1994, Cheminingwa i Vessey 2003, Graham i Vance 2003). Wyniki wielu doświadczeń wykazały, że efektywność zabiegu jest zauważalna tylko w warunkach braku lub deficytu liczby bakterii autochtonicznych. Zatem główną wadą szczepienia roślin jest niska konkurencyjność bakterii wprowadzanych do gleby względem szczepów tam bytujących. Liczebność tych drobnoustrojów w glebie zależy od czynników glebowo-klimatycznych oraz od agrotechniki (Sadowsky i Graham 1998, Graham i Vance 2003). W wieloletnich poletkowych i polowych badaniach Martyniuka i in. (1999b) wykazano, że istotny wpływ na liczbę bakterii brodawkowych w glebie ma wapnowanie oraz system gospodarowania. W gospodarstwach ekologicznych charakteryzujących się płodozmianem uwzględniającym rośliny bobowate populacja bakterii brodawkowych jest większa. Wyniki badań Martyniuka i in. (2005) dowiodły, że bakterie brodawkowe grochu, bobiku i koniczyny powszechnie występują w polskich glebach, a brak drobnoustrojów stwierdzono tylko w 3 z 80 analizowanych gleb. Natomiast niską liczebność diazotrofów odnotowano w 7 glebach lekkich, zwykle nadmiernie zakwaszonych. Prawdopodobnie na tych glebach nigdy nie uprawiano roślin bobowatych. Na zmniejszenie efektywności inokulacji mogą wpływać również chemiczne, fungicydowe zaprawy nasienne stosowane w uprawie roślin bobowatych (Martyniuk i in. 1999b, Martyniuk i in. 2002).

Symbiozę pomiędzy rizobiami a gospodarzem roślinnym można polepszyć również poprzez ingerencję w proces wymiany sygnałów molekularnych obu partnerów (Jones i in. 2007). W ostatnich latach zainteresowanie naukowców wzbudza wykorzystanie związków sygnalnych wydzielanych przez rizobia, tzw. czynników Nod. Wyizolowane ze specjalnie wyselekcjonowanych szczepów, o wysokiej wydajności symbiotycznej, czynniki Nod nawet w niewielkich ilościach, czyli tzw. submikromolarnych stężeniach ( $10^{-9}$ - $10^{-12}$  M) wpływają na wzrost i rozwój zarówno roślin bobowatych jak i roślin następczych (Atti i in. 2005, Miransari i Smith 2009). Biopreparat ten zwiększa biologiczną redukcję azotu atmosferycznego, a niekorzystne warunki środowiska (tj. deficyt lub nadmiar wody, pH, temperatura) oraz konkurencyjność organizmów autochtonicznych nie wpływa na jego działanie (Streeter 1994). Dodatkowo wspomaga wzrost siewek oraz przyśpiesza kiełkowanie (Prithiviraj i in 2003). Wyniki doświadczeń wykazały, że czynniki Nod stosowane w formie zaprawy lub oprysku korzystnie wpływały na efektywność symbiozy

oraz brodawkowanie w uprawie grochu (Siczek i in. 2014), wyki (Kidaj i in. 2012) oraz soi (Almaraz i in. 2011). Z kolei Pudełko i in. (2017), nie odnotowali istotnie większych różnic w plonie łubinu oraz wydajności brodawkowania po zastosowaniu czynników Nod w formie zaprawy w doświadczeniu polowym.

## **2.8. Rola czynników Nod i innych cząstek sygnałowych w procesie biologicznej redukcji azotu atmosferycznego**

W procesie biologicznej redukcji azotu atmosferycznego istotne znaczenie mają związki sygnałowe. Dialog molekularny pomiędzy roślinnym gospodarzem a odpowiednim szczepem bakteryjnym jest istotnym elementem efektywnej i wydajnej symbiozy obu organizmów. Dla procesu symbiozy bardzo ważne są flawonoidy wydzielane przez makrosymbionty, tj. rośliny bobowate. Związki te powodują chemotaktyczne przyciąganie rizobiów do włóśników korzeni oraz indukują geny brodawkowania (*nod*, *nol* i *noe*) kompetentnych symbiontów, określane mianem genów nod (ang. *nodulation genes*); (Deakin i Broughton 2009, Turska-Szewczuk i Russa 2004, Wielbo i Skorupska 2003). Flawonoidy jako metabolity wtórne spełniają również funkcje naturalnych przeciwutleniaczy, barwników oraz fungicydów i insektycydów, a także związków hamujących wzrost wybranych grup bakterii (Tsai i Phillips 1991). Te związki roślinne uaktywniają geny nod rizobiów, które są odpowiedzialne za kodowanie 25 białek służących do syntezy najistotniejszego, bakteryjnego sygnału molekularnego zwanego czynnikiem Nod (Gage 2004, Sujkowska 2009).

Czynnik Nod (ang. NF – *Nod factor*) to niskocząsteczkowy związek sygnałowy, który ze względu na podobieństwo rdzenia oligosacharydowego do fragmentu chityny nazywany jest lipochitooligosacharydem (LCO) (Oldroyd i Downie 2004). Czynniki te zbudowane są z 3-6 reszt N-acetylo-D-glukozaminy, które są połączone wiązaniem B(1-4) glikozydowym i kwasem tłuszczowym w pozycji C2 na końcu nieredukującym. Modyfikacje szkieletu podstawowego dotyczą długości rdzenia oligosacharydowego, typu kwasu tłuszczowego na końcu nieredukującym oraz liczby i typu podstawników (Mergaert i in. 1997, Downie 1998, D’Haeze i Holsters 2002, Stasiak i in. 2016). Bakteryjne czynniki Nod są najistotniejszym sygnałem w dialogu molekularnym pomiędzy organizmem wyższym a mikrosymbiontem. Czynniki te są morfogenami, które inicjują zmiany rozwojowe w roślinie, wpływając na dystrybucję fitohormonów w ich tkankach. Przyczyniają się do deformacji i skręcania włóśników korzeniowych (tzw. „laska pasterza”), umożliwiając przy tym wniknięcie rizobiów do systemu korzeniowego. Proces ten jest

wynikiem depolaryzacji błony cytoplazmatycznej, oscylacji poziomu wewnątrz komórkowego wapnia oraz tworzenia nici preinfekcyjnej. Czynniki Nod inicjują również podział komórek kory korzenia, przyczyniając się do wytworzenia nowych merystemów (Harris i in. 2003, Gage 2004, Oldroyd i in. 2011). Lipochitooligosacharydy są niezbędne do rozwoju nici infekcyjnej, dzięki której możliwa jest penetracja tkanek korzeni przez bakterie i dotarcie ich do miejsca powstawania brodawki korzeniowej (Jones i in. 2007). Nić infekcyjna powstaje w zajętych przez bakterie włosnikach korzenia. Jest to rurkowata struktura pochodzenia roślinnego, którą wypełniają namnażające się mikroorganizmy (Gage 2004). Nić infekcyjna transportuje i uwalnia na drodze endocytozy riziobia do zawiązka brodawki korzeniowej (primordium); (Gage 2004, Monahan-Giovanelli i in. 2006). Adsorbowane do włosników korzeni mikroorganizmy namnażają się, produkując przy tym duże ilości czynników Nod (Gage 2004). Jednak ich stężenie często ulega zmniejszeniu na skutek rozpadu lub degradacji przez mikroorganizmy glebowe (Ovtsyna i in. 2000).



### 3. METODYKA BADAŃ

#### 3.1. Warunki prowadzenia badań

Doświadczenie założono i prowadzono w latach 2020-2021, w warunkach hali wegetacyjnej Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach [51°24'59"N, 21°58'09"E] (rys.4). W badaniach wykorzystano wazony Mitscherlicha zawierające mieszaninę ziemi ogrodowej i piasku, w stosunku 5 kg ziemi i 2 kg piasku. W każdym wazonie wysiewano po 12 nasion grochu na głębokość 1,5 cm, a po wschodach dokonano przerywki pozostawiając po 5 roślin w wazonie. Wszystkie nasiona przed siewem zaprawiane były zaprawą grzybobójczą Sarox T 500 FS (0,4 l/100kg). Doświadczenie obejmujące 192 wazony zostało założone w układzie kompletnie zrandomizowanym. Dwuczynnikowy eksperyment założono w 3 powtórzeniach.



Rys.4. Doświadczenie z grochem siewnym na hali wegetacyjnej IUNG-PIB w Puławach

Przed założeniem doświadczenia pobrano próby glebowe, które przekazano do analizy chemicznej w celu określenia: odczynu oraz zawartości  $N_{\min}$  ( $N-NO_3$  i  $N-NH_4$ ), próchnicy ( $C_{org.}$ ) i innych ważniejszych makroelementów (tab.5). Analizy wykonano w akredytowanym Głównym Laboratorium Analiz Chemicznych (GLACH) IUNG-PIB w Puławach. Do eksperymentu wykorzystano glebę płąwą o składzie granulometrycznym piasku gliniastego mocnego, należąca do kompleksu żytniego bardzo dobrego, klasa bonitacyjna: IIIa – IVa. Gleba miała odczyn lekko kwaśny ( $pH_{KCL}$  6,5).

Nawożenie mineralne podawano w dwóch dawkach w dwóch fazach rozwojowych grochu: w fazie BBCH 14 oraz BBCH 16. Pożywki mineralne podawano wraz z

Tabela 5. Właściwości chemiczne gleby (w p.s.m.)

Parametr	Metoda badania	Norma	Jednostka	Wynik
pH <sub>KCL</sub>	potencjometryczna	PN-ISO 10390:1997	-	6,5
Sucha masa	wagowa	PN-ISO 15934:2013	%	99,5
Azot mineralny - sucha masa	wagowa	PN-EN 15934:2013	%	94,2
Azot mineralny N-NO <sub>3</sub>	CFA z detekcją spektrofotometryczną	PB 008-wyd.VI.02.2017	mg/kg	8,4
Azot mineralny N-NH <sub>4</sub>	CFA z detekcją spektrofotometryczną	PB 008-wyd.VI.02.2017	mg/kg	2,8
N	wysokotemperaturowego spalania z detekcją TC	PN-ISO 13878:2002	%	ponizej 0,05
Fosfor przyswajalny (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	spektrometryczna	PN-R-04023:1996	mg/100g	14,4
Potas przyswajalny (K <sub>2</sub> O)	FAES	PN-R-04022:1996+Az1:2002	mg/100g	12,9
Mg - magnez przyswajalny	FAAS	PN-R-04020:1994+Az1:2004	mg/100g	7,4
Siarka przyswajalna (S-SO <sub>4</sub> )	ICP-OES	PB 110.3-wyd.II-17.06.2013	mg/kg	1,07
C <sub>org.</sub>	miareczkowa	PB 021-wyd.III-02.04.2017	%	0,53
Mn	(ICP-OES	PB 111-wyd.III-15.03.2017	mg/kg	115
B	ICP-OES	PB 111-wyd.III-15.03.2017	mg/kg	4,9
Mo	ICP-OES	PB 111-wyd.III-15.03.2017	mg/kg	ponizej 0,05
Fe	ICP-OES	PB 111-wyd.III-15.03.2017	g/kg	4,56
P	ICP-OES	PB 111-wyd.III-15.03.2017	g/kg	0,26
K	FAES	PB 009-wyd.VII-13.04.2017	g/kg	1,13
Mg	FAES	PB 009-wyd.VII-13.04.2017	g/kg	0,81
Cu	FAAS	PB 009-wyd.VII-13.04.2017	g/kg	1,45
Zn	ICP-OES	PB 85.1-wyd.-01.08.2013	mg/kg	4,6

podlewaniem w łącznej dawce: N – 0,4 g/wazon w formie  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , P – 0,4 g/wazon w postaci  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , K – 0,8 g/wazon w postaci  $\text{K}_2\text{SO}_4$ . W obydwu latach prowadzenia doświadczenia została uwzględniona jedna odmiana grochu siewnego – Batuta (DANKO Hodowla Roślin sp. z o.o.). Jest to odmiana ogólnoużytkowa, wąsolistna o białych kwiatach, często wybierana do uprawy przez rolników. Należy do grupy najbardziej plennych odmian grochu siewnego, a jej średni plon w kraju w latach 2015-2017 wynosił 106% wzorca ogólnego plonu. Jest to odmiana wpisana do Polskiego Rejestru Odmian w 2009 roku, a od 2013 roku znajduje się na liście odmian zalecanych do uprawy w województwie lubelskim. Rośliny charakteryzuje bardzo dobra odporność na wyleganie w trakcie kwitnienia i dobra przed zbiorem. Odmiana ta wyróżnia się również bardzo dobrą równomiernością dojrzewania. Ponadto cechuje ją także wysoka odporność na choroby (tj. furazyjne wędniecie grochu, zgorzelowa plamistość grochu - askochytoza, mączniak prawdziwy, mączniak rzekomy); (<https://coboru.gov.pl>).

### 3.2. Czynniki doświadczenia

Czynnik I rzędu stanowiły 4 preparaty do zaprawiania nasion grochu siewnego:

- 1) woda zdeminielizowana (obiekt kontrolny,  $\text{H}_2\text{O}$ ),
- 2) preparat czynników Nod (LCOs) o stężeniu  $10^{-12}$  M/ $\text{dm}^{-3}$  wody,
- 3) molibden (Mo) w dawce 0,5 mg/wazon w formie  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ ,
- 4) preparat czynników Nod wraz z molibdenem (LCOs+Mo).

Czynnik II rzędu stanowiła wilgotność gleby: 30% ppw (stres suszy) i 60% ppw (warunki optymalne). Czynniki te uwzględniono w badaniach w 17 dniu po siewie nasion i utrzymywano na dwóch poziomach do końca okresu wegetacyjnego. Ilość zdeminielizowanej wody do podlewania roślin grochu ustalano każdorazowo metodą wagową, a rośliny podlewano dwukrotnie w ciągu dnia. Codziennie notowano temperaturę powietrza oraz ilość wody dostarczanej roślinom w celu oszacowania zapotrzebowania na wodę grochu siewnego. Uzyskane wyniki zestawiono i opracowano w formie graficznej w postaci wykresów.

Nasiona grochu na 1 godzinę przed wysiewem zaprawiano danym preparatem. Na 1 kg nasion zastosowano 10 ml każdego z roztworów. Ekstrakt zawierający rizobialne czynniki Nod wyizolowano z płynnej kultury szczepu bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GR09 (Rlv GR09), które hodowano w 1 litrze płynnego podłoża TY przez 24 godziny w 28°C i indukowano ekstraktem z flawonoidów roślinnych. Biopreparat

opracowano w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS w Lublinie (Maj i in. 2010).

### 3.3. Obserwacje i pomiary

Przez cały okres wegetacji prowadzono szczegółowe obserwacje wzrostu i rozwoju roślin. Notowano daty wystąpienia ważniejszych faz fenologicznych roślin grochu siewnego oraz daty wszystkich prac wykonywanych w doświadczeniu (tab.6).

Tabela 6. Daty prac wykonywanych w doświadczeniu w latach 2020 i 2021.

Wykonywane czynności	Rok prowadzenia doświadczenia	
	2020	2021
Siew	06.04.2020 r.	09.04.2021 r.
Nawożenie NPK (pierwsza dawka)	29.04.2020 r.	11.05.2021 r.
Nawożenie NPK (druga dawka)	08.05.2020 r.	18.05.2021 r.

W okresie wegetacji dokonano zbioru roślin w 4 termianach: T1, T2, T3 i T4 (tab.7). W fazie kwitnienia (BBCH 65) wykonano pomiary: biometryczne roślin, powierzchni liściowej, parametrów wymiany gazowej i fluorescencji chlorofilu oraz indeksu SPAD.

Tabela 7. Terminy zbioru roślin

Termin zbioru	Data		Faza BBCH	Faza rozwojowa
	I rok doświadczenia 2020	II rok doświadczenia 2021		
T1	27.05.2020 r.	27.05.2021 r.	17-18	7-8 liści
T2	15.06.2020 r.	08.06.2021 r.	65	kwitnienie
T3	29.06.2020 r.	23.06.2021 r.	79	zielony strąk
T4	06.07.2020 r.	05.07.2021 r.	89	dojrzałość pełna

### 3.3.1. Ocena wschodów roślin

Dynamikę wschodów roślin oceniano we wszystkich wazonach doświadczenia. W tym celu rośliny liczone każdego dnia w okresie od pojawienia się pierwszych siewek do czasu gdy nie przybywało już więcej roślin. Zawsze uwzględniano tylko odpowiednio kielkujące i prawidłowo wykształcone rośliny. Przy ocenie wschodów roślin analizowano jedynie wpływ preparatów na dynamikę wschodów. Wskaźnik dynamiki wschodów (Ed) obliczono z poniższego wzoru:

$$Ed = Ne/Ns \cdot 100\% (\%)$$

gdzie:

Ne – liczba wzeszłych roślin, Ns – liczba wysiewanych nasion.

### 3.3.2. Pomiary biometryczne roślin

W fazie rozwiniętego 4 liścia (BBCH 14) oraz podczas każdego zbioru (T1-T4) wykonywano pomiary biometryczne grochu określając wysokość rośliny do jej wierzchołka. W fazie dojrzałości pełnej (BBCH 89) mierzono także wysokość roślin do pierwszego i do ostatniego strąka. Podczas zbiorów (T1-T3) liczono również liczbę liści na roślinie grochu.

### 3.3.3. Określenie dynamiki przyrostu masy

Podczas każdego zbioru określano świeżą i suchą masę organów roślin (liści, łodyg, korzeni), w fazie pełni kwitnienia także liczbę i masę kwiatów, a w fazie zielonego strąka i dojrzałości pełnej liczbę oraz masę strąków i nasion.

Dynamikę przyrostu suchej masy określono na podstawie bezwzględnej szybkości wzrostu (GR) ocenianej według następującego wzoru (Evans 1972):

$$GR = (W2 - W1) / (T2 - T1) \text{ g/doba,}$$

gdzie:

W1 - sucha masa roślin na początku okresu pomiarowego,

W2 - sucha masa roślin na końcu okresu pomiarowego,

T1 - początek okresu pomiarowego,

T2 - koniec okresu pomiarowego.

### 3.3.4. Liczba i masa brodawek korzeniowych

W fazie kwitnienia (BBCH 65) oraz zielonego strąka (BBCH 79) dokonano analizy wskaźników biologicznej redukcji azotu atmosferycznego. W tym celu z każdego wazonu pobrano korzenie roślin grochu i płukano na metalowych sitach, a następnie obrywano brodawki korzeniowe w celu ustalenia ich liczby oraz świeżej i suchej masy. Określono również przeciętną masę 1 brodawki korzeniowej.

### 3.3.5. Pomiar parametrów wymiany gazowej

Parametry wymiany gazowej liści grochu oceniano za pomocą przenośnego aparatu CIRAS-2 (firma PP-Systems Company, USA) (rys.5). Urządzenie wyposażono w kuetę PLC(U) o wymiarach 25 mm x 7 mm z jednostką światła LED. Pomiar wykonywano na pierwszych od wierzchołka, w pełni rozwiniętych blaszkach liściowych przy stałych parametrach urządzenia: PAR –  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $\text{CO}_2$  – 380 ppm ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).



Rys. 5. Aparat do pomiaru parametrów wymiany gazowej CIRAS-2 PP Systems

Temperaturę kuwety ustawiano odpowiednio do aktualnej temperatury powietrza. Pomiar wykonywano zawsze pomiędzy godziną 7:00 a 11:30. W badaniu oceniano:

- Pn - intensywność fotosyntezy ( $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )
- E - intensywność transpiracji ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )
- Gs – przewodność szparkową ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )

Z otrzymanych parametrów oszacowano także współczynnik wykorzystania wody (WUE - ang. *Water Use Efficiency*), który wyliczono z poniższego wzoru (Sikder i in.2016):

$$\text{WUE} = \text{Pn} / \text{E} (\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mmol}^{-1} \text{H}_2\text{O})$$

gdzie: Pn – intensywność fotosyntezy netto; E – intensywność transpiracji

### 3.3.6. Pomiar fluorescencji chlorofilu

W fazie kwitnienia (BBCH 65) wykonano również pomiar fluorescencji chlorofilu *a*. Klips z zamkniętą płytką umieszczano na wybranych liściach grochu w celu adaptacji próbki w ciemności przez 20 minut powodującej „wygaszanie” jednej z faz fotosyntezy. Urządzenie wykorzystane do pomiarów wyposażone jest w diody o maksymalnej emisji 650 nm oraz w filtr bliskiej podczerwieni. Odczytów dokonywano za pomocą fluorymetru PocketPEA (Hansatech Instruments – GB) (rys.6) i tym samym analizowano ewentualny wpływ czynników stresowych (susza) na sprawność aparatu fotosyntetycznego roślin grochu. Ocenie poddano wskaźnik maksymalnej wydajności kwantowej fotosytemu II (Fv/Fm) oraz wskaźnik funkcjonowania fotosystemu II (PI).



Rys.6. Fluorymetr PocketPEA

### 3.3.7. Pomiar indeksu zieloności liścia

W badaniach indeksu zieloności liścia wykorzystano chlorofilometr SPAD-502 (Minolta Japan) (rys.7), którego działanie polega na pomiarze emisji dwóch wiązek światła: czerwonego (650 nm), który jest absorbowany przez chlorofil oraz podczerwonego o długości fali 950 nm. Aparat pozwala uzyskać różnicę pomiędzy światłem pochłoniętym przez liść przy obu wiązkach światła. Iloraz otrzymanych różnic stanowi indeks zieloności liścia wyrażony w jednostkach SPAD (ang. *Soil and Plant Analysis Development*); (Machul i Jadczyzyn 2005). Odżywienie roślin azotem ma wpływ na intensywność zielonej barwy liścia. Pomiar wykonywano na pierwszych od wierzchołka rośliny, w pełni wykształconych liściach, w ich środkowych częściach (Samborski i Rozbicki 2002). Wynik stanowił średnią arytmetyczną z 30 pomiarów wykonanych na jednym wazonie. Analizie poddano wszystkie

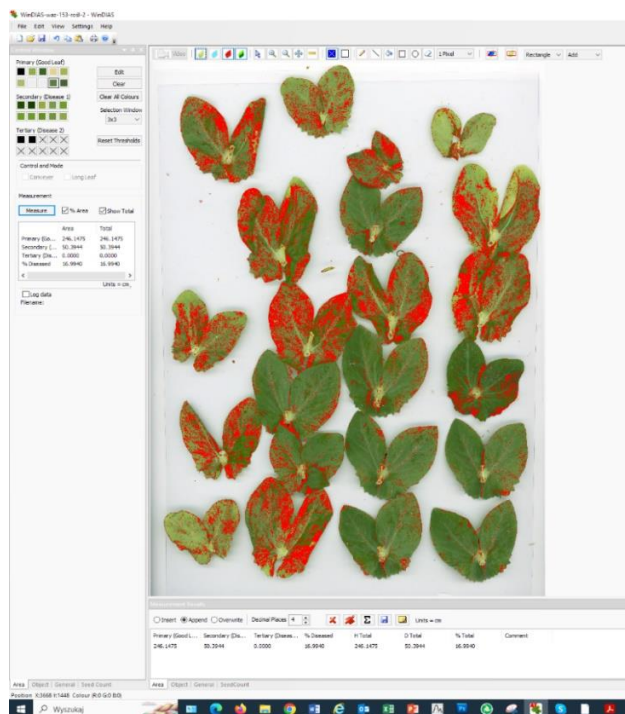
rośliny w doświadczeniu w fazie kwitnienia (BBCH 65).



Rys.7. Wskaźnik chlorofilu SPAD-502

### 3.3.8. Pomiar powierzchni liściowej

Pomiaru powierzchni liściowej dokonano w fazie kwitnienia (BBCH 65). Do oceny wykorzystano program *WinDIAS\_3* Leaf Image Analysis System opracowany przez brytyjską firmę Delta-T Devices Ltd (Cambridge, UK) (rys.8).



Rys.8. Pomiar powierzchni liści grochu przy użyciu systemu *WinDIAS\_3*



Materiał do pomiarów stanowiły losowo wybrane wazony z każdej kombinacji. Ocenie poddano wszystkie rośliny z danego wazonu. Rozwinięte liście grochu, po zerwaniu z rośliny, układano na podłączonym do systemu skanerze A4. Skanowane obiekty zapisywano w formie obrazu wraz z jego opisem na komputerze. Za pomocą systemu *WinDIAS\_3* dokonano pomiaru powierzchni liści oraz oszacowano ich zdrowotność, analizując ewentualne uszkodzenia i plamy spowodowane chorobami.

### 3.3.9. Pomiar korzeni

Podczas napełniania wazonów glebą w wazonach zainstalowano (pod kątem 45°) przezroczyste tuby rizotronowe o średnicy 56,8 mm i długości 30,0 cm w celu wykonywania zdjęć systemu korzeniowego, kamerą wchodzącą w skład rizotronu (In Situ Root Imager CI-600; CID Bio-Science, USA). Zdjęcia korzeni wykonano w 4 terminach, w następujących fazach fenologicznych grochu: BBCH 18, BBCH 65, BBCH 79 i BBCH 89, przy użyciu urządzenia CI-600 Digital Root Imager wyposażonego w skaner obrotowy (360°). Powierzchnia uzyskiwanego obrazu wynosiła 351,7 cm<sup>2</sup>. Obrazy korzeni mapowano (rys.9) i analizowano w programie Root Snap v. 1.3.2.25, stosując monitor HP LED Backlit Touch Screen Monitor. Określono długość i średnicę korzeni.



Rys.9. Tuby rizotronowe w doświadczeniu wazonowym z grochem

### 3.3.10. Określenie plonu i cech jego struktury

W fazie zielonego strąka (BBCH 79) oraz dojrzałości pełnej (BBCH 89) określono masę nasion z rośliny oraz elementy struktury plonu (tj. liczbę strąków na roślinie, liczbę nasion z rośliny, liczbę nasion w strąku oraz masę 1000 nasion). Po zbiorze roślin w fazie dojrzałości pełnej określono plon i cechy jego struktury.

### 3.3.11. Analiza składu chemicznego nasion

Nasiona zebrane z wszystkich obiektów doświadczenia przekazano do analiz laboratoryjnych i chemicznych. Analizy zostały wykonane w certyfikowanym Głównym Laboratorium Analiz Chemicznych IUNG-PIB w Puławach. Oceniane parametry wraz z metodą ich badania zestawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Metody badań w analizie chemicznej nasion

Parametr	Metoda badania
Sucha masa	metoda wagowa
Białko ogólne	analiza przepływowa (CFA) z detekcją spektrometryczną
Popiół	metoda wagowa
Tłuszcz	analiza wagowa
Włókno surowe	analiza wagowa
Bezazotowe związki wyciągowe (BAW)	sucha masa – (popiół+białko ogólne+tłuszcz+włókno surowe)
N	analiza przepływowa (CFA) z detekcją
P	analiza przepływowa (CFA) z detekcją
K	FAES
Mg	FAAS
S	ICP-OES
Fe	ICP-OES
Mn	FAAS
Mo	ICO-OES

### 3.4. Obliczenia statystyczne

Do oceny statystycznej uzyskanych wyników został wykorzystany program Statistica v. 13.1. Wyniki poddane analizie stanowiły średnią z 3 powtórzeń i z dwóch lat badań. Eksperyment obejmował 8 obiektów doświadczalnych, w których oceniono wpływ dwóch

czynników na różnych poziomach: 1) preparat – działający na czterech poziomach (H<sub>2</sub>O, LCOs, Mo, LCOs+Mo) oraz 2) wilgotność gleby – działający na 2 poziomach (30 i 60%). Układ doświadczenia był układem kompletnym, badania obejmowały wszystkie kombinacje poziomów analizowanych czynników. Jednostkę doświadczalną stanowił wazon Mitscherlicha.

Przed wykonaniem analizy statystycznej postawiono 3 hipotezy statystyczne (zerowe), w których założono, że:

$$H_{01}: \mu_{H_2O} = \mu_{LCOs} = \mu_{Mo} = \mu_{LCOs+Mo}$$

$$H_{02}: \mu_{30} = \mu_{60}$$

H<sub>03</sub>: brak interakcji

Wykonano analizę wariancji (ANOVA) dla układów dwuczynnikowych dla wybranych cech roślin. W analizie wariancji założono, że:

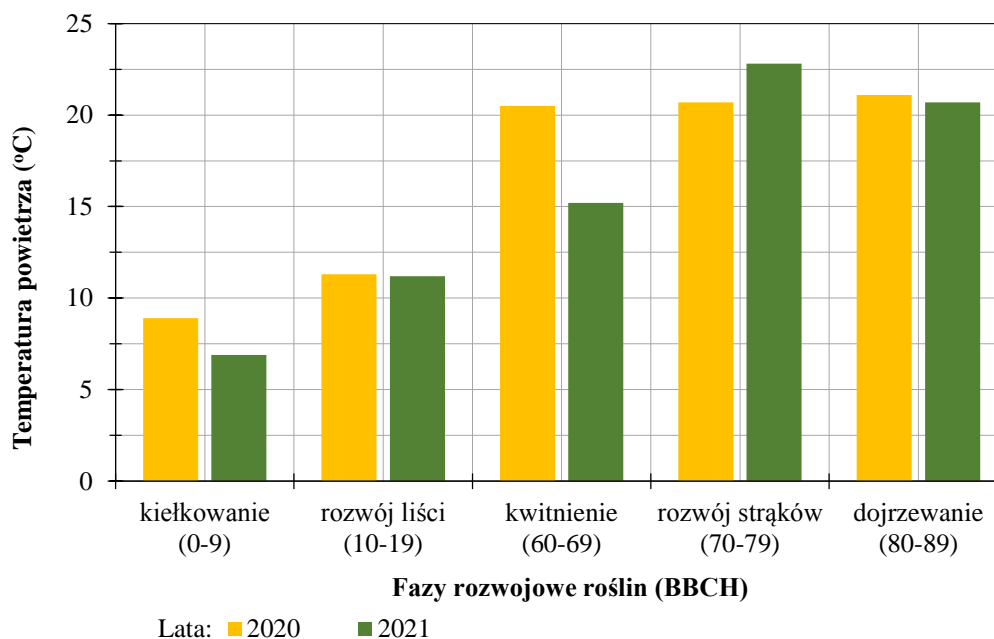
- 1) Zmienne są zależne, ilościowe,
- 2) Normalność rozkładu zmiennych zależnych w obiektach (normalność rozkładu sprawdzano testem Shapiro-Wilka),
- 3) Występuje równość wariancji.

Istotność różnic oceniono przy wykorzystaniu testu Tukey'a przy poziomie istotności  $\alpha=0,05$ . Uzyskane wyniki badań opracowano i zestawiono w formie tabelarycznej i graficznej. Prezentowane wyniki (poza określeniem potrzeb wodnych) stanowią średnie z 2 lat badań, ponieważ między latami nie odnotowano istotnych różnic w odniesieniu do analizowanych cech roślin.

## 4. WYNIKI

### 4.1. Określenie potrzeb wodnych grochu siewnego

Zapotrzebowanie grochu siewnego na wodę w latach 2020-2021 zależało między innymi od fazy rozwojowej rośliny. W fazie kiełkowania nasion (BBCH 0-9) średnia dobową temperaturę powietrza w kwietniu 2020 i 2021 roku wynosiła odpowiednio: 8,9 i 6,9°C (rys.10). Najwyższą średnią dobową temperaturę powietrza w obydwu latach badań odnotowano w okresie rozwoju strąków (BBCH 70-79).

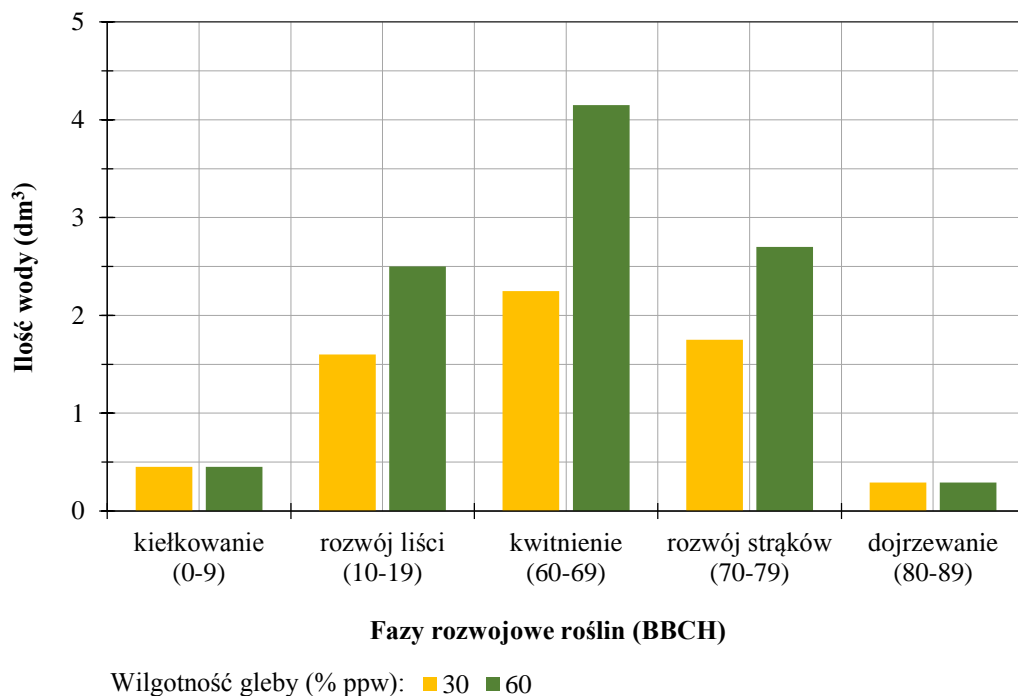


Rys. 10. Średnia dobową temperatura powietrza w latach 2020-2021

W roku 2020 nasiona grochu pobrały w okresie kiełkowania średnio 0,45 dm<sup>3</sup> wody, a w roku 2021 - 0,40 dm<sup>3</sup> (rys.11 i rys.12). Wraz ze wzrostem i rozwojem roślin zwiększało się również ich zapotrzebowanie na wodę. W okresie rozwoju liści (BBCH 10-19) ilość pobranej wody w pierwszym roku badań wyniosła średnio 1,6 dm<sup>3</sup> (30% ppw) i 2,5 dm<sup>3</sup> (60% ppw). W 2021 roku rośliny na obiektach doświadczalnych będące pod wpływem stresu suszy pobierały średnio 1,65 dm<sup>3</sup>, a w warunkach optymalnych 2,3 dm<sup>3</sup> wody. Średnia dobową temperatura powietrza w tej fazie rozwojowej roślin była podobna w obu latach badań i wyniosła 11,3°C w pierwszym i 11,2°C w drugim roku badań.

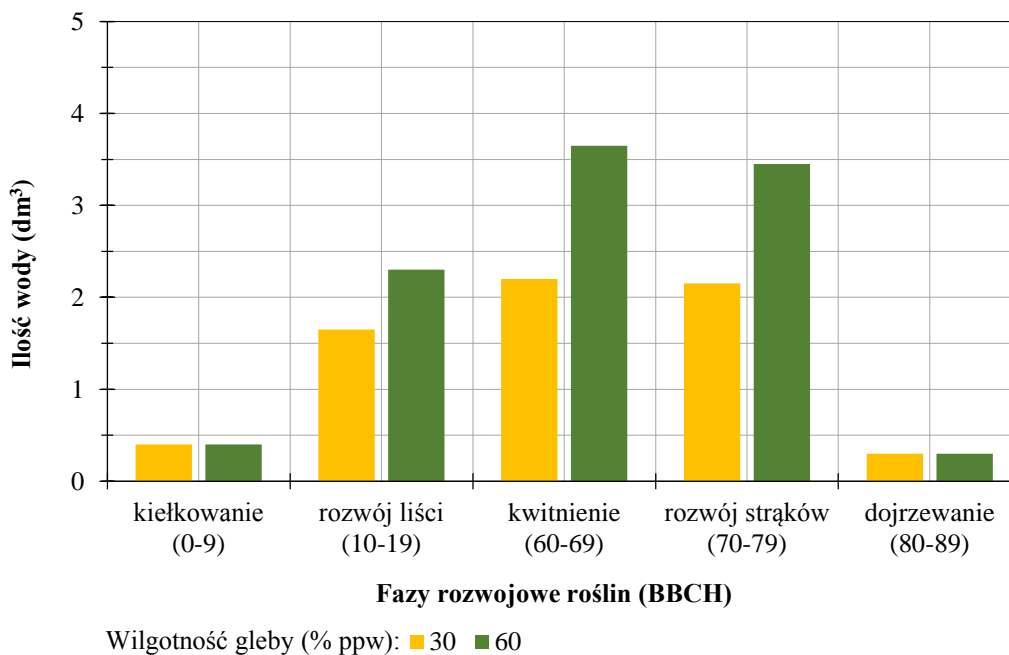
Najwięcej wody rośliny pobierały w okresie kwitnienia (BBCH 60–69) oraz wytwarzania strąków (BBCH 70–71). Zapotrzebowanie roślin grochu na wodę w ciągu tych okresów rozwoju było zróżnicowane i zależało przede wszystkim od temperatury powietrza. W okresie kwitnienia roślin średnia temperatura powietrza wynosiła 20,5°C w 2020 roku i 15,2°C w 2021 roku. W pierwszym roku badań rośliny pobierały w tej fazie średnio 2,25

dm<sup>3</sup> wody (30% ppw) i 4,15 dm<sup>3</sup> (60% ppw), a w 2021 roku odpowiednio: 2,20 dm<sup>3</sup> i 3,65 dm<sup>3</sup> wody. Średnia dobową temperatura powietrza w 2021 roku w fazie rozwoju strąków grochu siewnego wyniosła 22,8°C i była wyższa w porównaniu ze średnią z 2020 roku (20,7°C). Odnotowano zatem większe zapotrzebowanie na wodę roślin grochu w fazie BBCH 70–79 w roku 2021 (2,15 dm<sup>3</sup> - 30% ppw i 3,45 dm<sup>3</sup> – 60% ppw) w porównaniu z pierwszym rokiem badań (1,75 dm<sup>3</sup> – 30% ppw i 2,70 dm<sup>3</sup> – 60% ppw).



Rys. 11. Ilość wody użytej do podlewania w różnych fazach wzrostu i rozwoju roślin (2020)

W późniejszych etapach rozwoju odnotowano stopniowe zmniejszenie zapotrzebowania roślin na wodę. W ostatniej fazie rozwojowej roślin (BBCH 80-89) zapotrzebowanie na wodę grochu było najmniejsze w całym okresie wegetacji pomimo wysokich średnich dobowych temperatur powietrza w tej fazie rozwojowej (21,1°C – 2020 r. i 20,7°C – 2021 r.). Średnia ilość wody pobranej przez rośliny w jednym wazonie w fazie dojrzałości pełnej przy 30 i 60% ppw wyniosła odpowiednio: 0,29 i 0,29 dm<sup>3</sup> w pierwszym roku badań i odpowiednio: 0,30 i 0,30 dm<sup>3</sup> w drugim roku badań. Natomiast ilość wody pobranej przez rośliny w ciągu całego okresu wegetacji w 2020 roku w warunkach suszy i w optymalnych warunkach wilgotności gleby wynosiła odpowiednio: 6,34 i 10,09 dm<sup>3</sup>. Wskaźniki te dla roku 2021 wynosiły odpowiednio: 6,70 i 10,01 dm<sup>3</sup>.



Rys. 12. Ilość wody użytej do podlewania w różnych fazach wzrostu i rozwoju roślin (2021)

#### 4.2. Dynamika wschodów roślin

Wykazano, że zaprawianie nasion grochu siewnego poszczególnymi preparatami nie wpłynęło na termin rozpoczęcia ich kiełkowania. Pierwsze wschody w każdym z badanych obiektów wystąpiły po 5 dniach od siewu. Preparat czynników Nod oraz preparat zawierający połączenie LCOs+Mo determinowały późniejszą dynamikę wschodów, szczególnie pomiędzy 5 a 7 dniem od siewu.

We wszystkich analizowanych obiektach uzyskano bardzo dobre wschody roślin wynoszące średnio dla obiektu kontrolnego 91,7% (tab.9). Wskaźnik dynamiki wschodów

Tabela 9. Dynamika wschodów roślin grochu (%) w zależności od zastosowanego preparatu

Preparat	Czas od siewu (dni)					
	5	7	9	11	14	16
H <sub>2</sub> O	16,7	38,9	50,0	66,7	77,8	91,7
LCOs	22,2	54,8	63,9	75,0	80,6	94,4
Mo	19,4	47,2	52,8	69,4	80,6	94,4
LCOs+Mo	25,0	61,1	69,4	77,8	83,3	97,2

roślin wyrosłych z nasion zaprawianych przed siewem wyłącznie molibdenem lub preparatem czynników Nod był identyczny i wyniósł średnio 94,4%. Jednak najlepszy efekt uzyskano w obiektach, w których nasiona zaprawiano roztworem łączącym obydwie preparaty, tj. LCOs+Mo (97,2%). Zakończenie wschodów odnotowano po 17 dniach od siewu nasion.

### **4.3. Wysokość roślin**

Z przeprowadzonych badań wynika, że wysokość roślin grochu we wszystkich analizowanych fazach rozwojowych była determinowana przez wilgotność gleby oraz rodzaj preparatu (tab.10). Najlepsze efekty uzyskano zaprawiając nasiona przed siewem preparatem LCOs wraz z molibdenem. Preparat czynników Nod w połączeniu z molibdenem najbardziej zmniejszał niekorzystny wpływ warunków stresowych na wzrost roślin.

W początkowym okresie wzrostu i rozwoju roślin (BBCH 14) wykazano istotny wpływ preparatów na wysokość grochu, przy czym największą wysokość osiągnęły rośliny wyrosłe z nasion zaprawianych roztworem LCOs+Mo i rosnące w optymalnych warunkach wilgotności gleby (średnio 10,7 cm). Najniższe rośliny wyrosły na obiekcie kontrolnym, których średnia wysokość wynosiła 9,6 cm (30% ppw) i 9,9 cm (60% ppw). Bez względu na poziom wilgotności gleby, istotnie wyższe niż na obiekcie kontrolnym były rośliny, które wyrosły z nasion zaprawianych czynnikami Nod lub samym molibdenem.

W fazie wykształcania 7-8 liścia (BBCH 18) najniższe rośliny grochu stwierdzono na obiekcie kontrolnym i na obiekcie z czynnikiem stresowym, tj. deficytem wody (średnio 40,2 cm). Istotnie wyższe niż na obiekcie kontrolnym były jedynie rośliny zaprawiane preparatem LCOs+Mo, rosnące w optymalnych warunkach wilgotności gleby (średnio 46,0 cm). Bez względu na poziom wilgotności gleby, zastosowane preparaty LCOs oraz Mo nie różnicowały istotnie wysokości roślin.

W warunkach stresu suszy, w okresie kwitnienia (BBCH 65) rośliny grochu wyrosłe z nasion niezaprawianych osiągnęły najniższą wysokość (średnio 59,5 cm). Rośliny te były istotnie niższe od roślin, które wyrosły z nasion zaprawianych roztworem zawierającym czynniki Nod i molibden (średnio 64,5 cm). Nie wykazano jednak istotnych różnic w działaniu preparatów H<sub>2</sub>O i LCOs w odniesieniu do wysokości roślin. W optymalnych warunkach wilgotności gleby istotnie niższe rośliny wyrosły na obiekcie kontrolnym (średnio 60,2 cm) w porównaniu do roślin zaprawianych preparatem czynników Nod,

Tabela 10. Wysokość roślin w zależności od zastosowanych czynników i fazy rozwojowej grochu (cm)

Czynnik doświadczenia		Fazy rozwojowe roślin grochu (BBCH)				
Wilgotność gleby (% ppw); (II)	Preparat (I)	14	18	65	79	89
30	H <sub>2</sub> O	9,6a*	40,2a	59,5a	60,5a	61,6a
	LCOs	10,2c	43,0ab	63,1ab	63,5bc	64,3c
	Mo	9,9b	42,4ab	62,6b	63,2b	63,5b
	LCOs+Mo	10,4d	44,2ab	64,5d	64,8d	65,1c
60	H <sub>2</sub> O	9,9ab	42,8ab	60,2a	60,9a	61,9a
	LCOs	10,3cd	45,2b	64,0d	64,3cd	65,2c
	Mo	10,2c	44,6b	63,5bcd	63,7bc	64,4c
	LCOs+Mo	10,7e	46,0b	64,7d	65,8e	68,1d
Średnia dla preparatu	H <sub>2</sub> O	9,7a	41,5a	59,8a	60,7a	61,7a
	LCOs	10,2c	44,1ab	63,6b	63,9b	64,7c
	Mo	10,0b	43,5ab	63,0b	63,4b	63,9b
	LCOs+Mo	10,6d	45,1b	64,6c	65,3c	66,6d
Średnia dla wilgotności gleby	30% ppw	10,0a	42,4a	62,4a	63,0a	63,6a
	60% ppw	10,3b	44,6b	63,1b	63,6b	64,9b
NIR I ( $\alpha=0,05$ )**		0,16	2,96	0,85	0,62	0,60
NIR II ( $\alpha=0,05$ )		0,11	2,09	0,60	0,43	0,42
NIR I*II ( $\alpha=0,05$ )		0,23	4,19	1,20	0,87	0,85

\*Liczby w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy poziomie istotności  $\alpha=0,05$ .

\*\*NIR – najmniejsza istotna różnica między analizowanymi grupami.



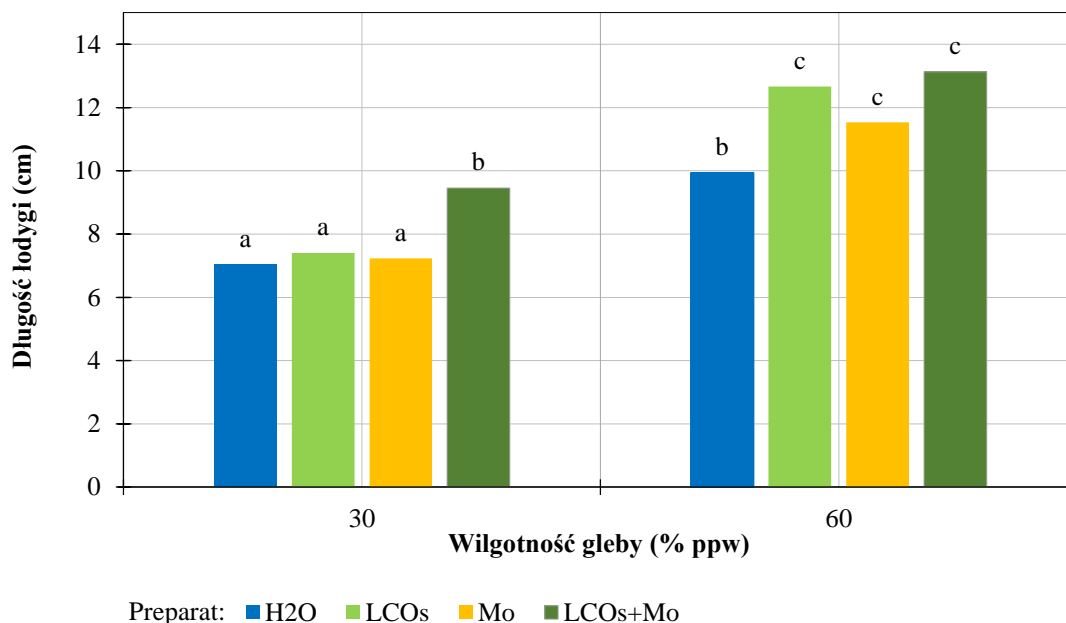
molibdenem oraz roztworem łączącym obydwie preparaty. Nie udowodniono istotnych statystycznie różnic między średnią wysokością roślin wyrosłych z nasion zaprawianych preparatami: LCOs+Mo, LCOs i Mo, których wysokość wynosiła odpowiednio: 64,7; 64,0 i 63,5 cm.

W fazie zielonego strąka (BBCH 79) istotnie wyższe rośliny wyrosły z nasion zaprawianych preparatem LCOs+Mo w optymalnych warunkach wilgotności gleby (średnio 65,8 cm) niż pozostałych obiektów. Zarówno preparat zawierający czynniki Nod, jak i molibden korzystnie oddziaływały na wysokość roślin grochu, bez względu na poziom wilgotności gleby. Rośliny wyrosłe z nasion zaprawianych tymi preparatami były istotnie wyższe niż na obiekcie kontrolnym zarówno w warunkach stresu suszy jak i w optymalnych warunkach wilgotności gleby.

W ostatniej fazie rozwojowej grochu (BBCH 89) wykazano, że zastosowanie preparatów Nod oraz Mo miało zróżnicowany wpływ na wysokość roślin. Bez względu na poziom wilgotności gleby, zarówno preparat czynników Nod, jak i molibden korzystnie oddziaływały na wzrost roślin; rośliny te były istotnie wyższe od obiektu kontrolnego. Jednak najlepsze efekty w odniesieniu do wysokości roślin uzyskano stosując preparat LCOs+Mo (średnio 65,1 cm – 30% ppw i 68,1 cm – 60% ppw).

#### **4.4. Długość łodygi ze strąkami**

Stres suszy miał wpływ na długość łodygi grochu ze strąkami. Rośliny będące pod wpływem działania czynnika stresowego charakteryzowały się krótszą częścią łodygi ze strąkami w porównaniu do roślin rosnących w optymalnych warunkach wilgotności gleby, średnio o 34,1% (rys.13). Najkrótszą tę część łodygi odnotowano w przypadku roślin rosnących na obiekcie kontrolnym (średnio 7,03 cm). Długość ta nie różniła się jednak istotnie od długości łodygi roślin wyrosłych z nasion zaprawianych molibdenem (średnio 7,23 cm) i preparatem czynników Nod (średnio 7,40 cm). Najdłuższą częścią łodygi ze strąkami charakteryzowały się rośliny wyrosłe z nasion zaprawianych preparatem LCOs+Mo (średnio 9,46 cm). Długość ta nie różniła się istotnie od długości stwierdzonej w przypadku roślin grochu na obiekcie kontrolnym, rosnących w optymalnych warunkach wilgotności gleby (średnio 9,93 cm). Istotnie dłuższą część łodygi ze strąkami od pozostałych obiektów stwierdzono w obiektach z optymalną wilgotnością gleby po zastosowaniu przedsięwziętego zaprawiania nasion preparatem czynników Nod (średnio 12,66 cm), molibdenem (średnio 11,53 cm) oraz obydwoma preparatami razem (średnio 13,13 cm).



Rys. 13. Długość łodygi ze strąkami w fazie BBCH 89

#### 4.5. Liczba liści

W fazie BBCH 18 wilgotność gleby nie różnicowała istotnie liczby liści u roślin grochu (tab.11). Średnia liczba liści na roślinie wyniosła 6,08 w obiektach z niekorzystnymi warunkami środowiska i 6,66 dla roślin rosnących w warunkach optymalnych. Stres suszy determinował natomiast liczbę liści w fazie kwitnienia oraz zielonego strąka. Wykazano, że deficyt wody w glebie przyczynił się do redukcji liczby liści o 13,9% w fazie BBCH 65 i o 8,7% w fazie zielonego strąka.

W fazie BBCH 18 rośliny zaprawiane przedsięwzięciem preparatem zawierającym mieszaninę rizobialnych czynników Nod i molibdenu charakteryzowały się istotnie większą liczbą liści (średnio 7,50) w porównaniu z roślinami zaprawianymi molibdenem (średnio 5,83) oraz obiektem kontrolnym (średnio 5,66). Nie wykazano jednak istotnej różnicy w działaniu preparatu LCOs+Mo oraz roztworu zawierającego jedynie czynniki Nod. Zarówno w fazie BBCH 65 jak i BBCH 79 stosowane preparaty istotnie różnicowały liczbę liści grochu. Wykazano, że roztwór LCOs i molibden korzystnie wpłynęły na liczbę liści w porównaniu z obiektem kontrolnym, przy czym lepsze efekty odnotowano dla roślin zaprawianych roztworem LCOs niż samym Mo. Jednak największą liczbę liści uzyskano z obiektu, w którym stosowano roztwór LCOs+Mo zarówno w fazie kwitnienia (średnio 24,0) jak i zielonego strąka (średnio 24,5). Preparat ten spowodował wzrost liczby liści o 20,8% (BBCH 65) i o 22,5% (BBCH 79) w porównaniu z obiektem kontrolnym.

Tabela 11. Liczba liści wykształconych na roślinie grochu w zależności od fazy rozwojowej grochu i zastosowanych czynników

Czynnik doświadczenia		Fazy rozwojowe roślin grochu (BBCH)		
Wilgotność gleby (% ppw); (II)	Preparat (I)	18	65	79
30	H <sub>2</sub> O	5,66a*	17,00a	18,00a
	LCOs	6,00ab	21,00c	22,00c
	Mo	5,66a	19,00b	20,00b
	LCOs+Mo	7,00ab	23,00d	24,00de
60	H <sub>2</sub> O	5,66a	21,00c	20,00b
	LCOs	7,00ab	24,00de	24,00de
	Mo	6,00ab	23,00d	23,00cd
	LCOs+Mo	8,00b	25,00e	25,00e
Średnia dla preparatu	H <sub>2</sub> O	5,66a	19,00a	19,00a
	LCOs	6,50ab	22,50c	23,00c
	Mo	5,83a	21,00b	21,50b
	LCOs+Mo	7,50b	24,00d	24,50d
Średnia dla wilgotności gleby	30% ppw	6,08a	20,00a	21,00a
	60% ppw	6,66a	23,25b	23,00b
NIR I ( $\alpha=0,05$ )**		1,499	1,223	1,223
NIR II ( $\alpha=0,05$ )		1,060	0,865	0,865
NIR I*II ( $\alpha=0,05$ )		2,119	1,730	1,730

\*Liczby w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy poziomie istotności  $\alpha=0,05$ .

\*\*NIR – najmniejsza istotna różnica między analizowanymi grupami.

#### 4.6. Dynamika przyrostu suchej masy

Wyniki badań wykazały, że dynamika przyrostu suchej masy roślin zależała od poziomu wilgotności gleby, fazy rozwojowej rośliny oraz rodzaju zastosowanego preparatu (tab.12). Niezależnie od poziomu wilgotności gleby dynamika przyrostu części nadziemnej

Tabela 12. Kształtowanie się wskaźnika bezwzględnej szybkości wzrostu roślin (GR) w zależności od zastosowanego czynnika i fazy rozwojowej grochu ( $\text{g}\cdot\text{doba}^{-1}$ )

Czynnik doświadczenia		Faza rozwojowa grochu (BBCH)			
Wilgotność gleby (%); (II)	Preparat (I)	00-18	18-65	65-79	79-89
Część nadziemna					
30	H <sub>2</sub> O	0,06	0,20	0,81	0,50
	LCOs	0,10	0,21	0,93	0,57
	Mo	0,09	0,21	0,99	0,57
	LCOs+Mo	0,10	0,22	1,08	0,63
60	H <sub>2</sub> O	0,08	0,27	1,00	0,73
	LCOs	0,11	0,29	1,16	0,83
	Mo	0,10	0,30	1,12	0,80
	LCOs+Mo	0,12	0,33	1,31	0,97
Korzenie					
30	H <sub>2</sub> O	0,02	0,17	0,58	-0,30
	LCOs	0,02	0,13	0,67	-0,21
	Mo	0,02	0,13	0,60	-0,21
	LCOs+Mo	0,02	0,11	0,75	-0,17
60	H <sub>2</sub> O	0,04	0,16	0,37	-0,31
	LCOs	0,04	0,25	0,60	-0,21
	Mo	0,04	0,23	0,53	-0,20
	LCOs+Mo	0,05	0,27	0,69	-0,17

grochu zwiększała się do fazy zielonego strąka, a w końcowej fazie wegetacji odnotowano znaczny jej ubytek. Deficyt wody w glebie spowodował zmniejszenie dynamiki przyrostu masy części nadziemnej roślin grochu, szczególnie w fazie zielonego strąka. Z powodu suszy wskaźnik GR części nadziemnej grochu w tej fazie wegetacyjnej był niższy o 16,7% w porównaniu do roślin rosnących w warunkach optymalnych. Niezależnie od poziomu wilgotności gleby największą dynamikę przyrostu masy korzeniowej stwierdzono w fazie zielonego strąka, a w fazie dojrzałości pełnej odnotowano znaczne zmniejszenie wartości wskaźnika GR. Susza determinowała wzrost i rozwój korzeni roślin grochu, powodując przyrost ich masy szczególnie w fazie zielonego strąka. Deficyt wody w tej fazie spowodował zwiększenie wskaźnika GR masy korzeniowej roślin średnio o 16,9%.

We wszystkich analizowanych fazach rozwojowych stwierdzono korzystny wpływ preparatu czynników Nod oraz molibdenu na wartość wskaźnika bezwzględnej szybkości wzrostu części nadziemnej grochu, jednak najlepszy efekt uzyskano stosując łącznie obydwie preparaty. Przedsewne zaprawianie nasion roztworem LCOs, molibdenem oraz LCOs+Mo przyczyniło się do wzrostu wskaźnika GR części nadziemnej grochu w fazie zielonego strąka odpowiednio o: 13,5, 14,3 i 24,4%. Wspomniane powyżej preparaty determinowały dynamikę przyrostu suchej masy korzeni roślin. W końcowej fazie wegetacji największy ubytek masy korzeni odnotowano na obiekcie kontrolnym. Wskaźnik GR korzeni roślin grochu zaprawianych przedsewnie preparatem czynników Nod, molibdenem oraz LCOs+Mo miał wówczas większą wartość w stosunku do kontroli.

#### **4.7. Liczba i masa brodawek korzeniowych**

W fazie kwitnienia grochu (BBCH 65) wilgotność gleby istotnie różnicowała liczbę brodawek (tab.13). Deficyt wody w glebie w tej fazie rozwojowej spowodował spadek ich liczebności o 18,8%. Na liczbę brodawek korzeniowych grochu istotny wpływ miał również rodzaj zastosowanego preparatu. Wykazano, że rośliny zaprawiane przedsewnie roztworem zawierającym czynniki Nod i molibden charakteryzowały się istotnie większą liczbą brodawek na korzeniach (średnio 75,8) w porównaniu z roślinami zaprawianymi wyłącznie LCOs (średnio 67,1), molibdenem (średnio 65,0) oraz wodą - obiektem kontrolnym (średnio 59,0). Molibden oraz roztwór rizobialnych czynników Nod zwiększyły istotnie liczbę brodawek w porównaniu do obiektu z nasionami niezaprawianymi. Z przeprowadzonych badań wynika, że istotnie wyższą, od pozostałych obiektów, liczbą brodawek korzeniowych wyróżniały się rośliny zaprawiane roztworem LCOs+Mo i uprawiane w warunkach

Tabela 13. Wskaźniki biologicznej redukcji azotu atmosferycznego w fazie kwitnienia grochu (BBCH 65)

Czynnik doświadczenia		Wskaźniki biologicznej redukcji N <sub>2</sub>			
Wilgotność gleby (%); (II)	Preparat (I)	Liczba brodawek korzeniowych na roślinie	Świeża masa brodawek korzeniowych (mg/roślina)	Sucha masa brodawek korzeniowych (mg/roślina)	Sucha masa 1 brodawki korzeniowej (mg)
30	H <sub>2</sub> O	50,6a*	0,22a	57,3a	1,12b
	LCOs	60,6bc	0,29bc	59,7ab	0,99ab
	Mo	58,3ab	0,25ab	59,0ab	1,01ab
	LCOs+Mo	69,6d	0,31cd	64,8c	0,95a
60	H <sub>2</sub> O	67,3cd	0,31cd	63,2bc	0,93a
	LCOs	73,6d	0,36e	64,6c	0,87a
	Mo	71,6d	0,35de	64,5c	0,89a
	LCOs+Mo	82,0e	0,39e	71,1d	0,86a
Średnia dla preparatu	H <sub>2</sub> O	59,0a	0,26a	60,2a	1,03b
	LCOs	67,1b	0,33c	62,1a	0,93a
	Mo	65,0b	0,30b	61,8a	0,95ab
	LCOs+Mo	75,8c	0,35c	67,9b	0,90a
Średnia dla wilgotności gleby	30% ppw	59,8a	0,27a	60,2a	1,02b
	60% ppw	73,6b	0,35b	65,8b	0,89a
NIR I ( $\alpha=0,05$ )**		3,524	0,021	1,888	0,070
NIR II ( $\alpha=0,05$ )		2,492	0,015	1,335	0,049
NIR I*II ( $\alpha=0,05$ )		4,984	0,030	2,670	0,099

\*Liczby w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy poziomie istotności  $\alpha=0,05$ .

\*\*NIR – najmniejsza istotna różnica między analizowanymi grupami.

optymalnej wilgotności gleby (średnio 82,0). Stres suszy determinował również świeżą oraz suchą masę brodawek. Deficyt wody w glebie spowodował obniżenie świeżej masy brodawek korzeniowych średnio o 20,5%, co z kolei wiązało się także z ich niższą suchą masą. Na wzrost świeżej masy brodawek korzeniowych miał również wpływ rodzaj zastosowanego preparatu. W badaniach wykazano, że preparaty LCOs, Mo oraz LCOs+Mo spowodowały wzrost świeżej masy brodawek w porównaniu z obiektem kontrolnym odpowiednio o: 21,2, 13,3 i 25,7%. Z kolei istotnie wyższą suchą masę brodawek od pozostałych obiektów odnotowano u roślin wyrosłych z nasion zaprawianych przedsięwzięciem roztworem LCOs+Mo. Wykazano jednak, że sucha masa pojedynczej brodawki korzeniowej roślin wyrosłych w warunkach niedoboru wody w glebie jest istotnie wyższa w porównaniu do suchej masy pojedynczej brodawki roślin rosnących w optymalnych warunkach uwilgotnienia. Największą suchą masę pojedynczej brodawki odnotowano u roślin z obiektu kontrolnego. Z kolei wartość ta nie różniła się istotnie od suchej masy pojedynczej brodawki roślin wyrosłych z nasion zaprawianych molibdenem.

W fazie zielonego strąka (BBCH 79) odnotowano spadek liczby brodawek korzeniowych w porównaniu z danymi uzyskanymi w fazie kwitnienia grochu (BBCH 65) (tab.14). W tej fazie stres suszy również determinował liczebność brodawek. Deficyt wody w glebie przyczynił się do spadku liczby brodawek o 22,2% w porównaniu do ich liczby na korzeniach roślin z obiektu o warunkach optymalnych. U roślin zaprawianych przedsięwzięciem preparatem łączącym rizobialne czynniki Nod oraz molibden odnotowano istotnie wyższą liczbę brodawek w porównaniu do ich liczby stwierdzonej na roślinach z pozostałych obiektów. Zarówno preparat LCOs jak i Mo korzystnie wpłynęły na liczbę brodawek korzeniowych roślin, która była istotnie wyższa w porównaniu z obiektem kontrolnym. Rośliny wyrosłe z nasion zaprawianych przedsięwzięciem roztworem LCOs+Mo, w warunkach optymalnego uwilgotnienia gleby, charakteryzowały się najwyższą liczbą brodawek (średnio 54,6) w porównaniu z pozostałymi obiektami. Wilgotność gleby wpłynęła również na świeżą oraz suchą masę brodawek. U roślin rozwijających się w warunkach stresowych świeża i sucha masa brodawek była istotnie niższa w porównaniu do obiektów, w których wilgotność gleby była na poziomie 60% ppw. Preparat czynników Nod oraz roztwór LCOs+Mo istotnie zwiększyły świeżą masę brodawek w porównaniu do obiektów niezaprawianych lub zaprawianych wyłącznie molibdenem. Najwyższą suchą masę brodawek odnotowano u roślin zaprawianych preparatem LCOs+Mo; masa ta była istotnie wyższa od suchej masy brodawek roślin na pozostałych obiektach. Zwiększenie liczby brodawek na korzeniach roślin grochu w wyniku zastosowania zaprawy nasiennej w postaci

Tabela 14. Wskaźniki biologicznej redukcji azotu atmosferycznego w fazie zielonego strąka (BBCH 79)

Czynnik doświadczenia		Wskaźniki biologicznej redukcji N <sub>2</sub>			
Wilgotność gleby (%); (II)	Preparat (I)	Liczba brodawek korzeniowych na roślinie	Świeża masa brodawek korzeniowych (mg/roślina)	Sucha masa brodawek korzeniowych (mg/roślina)	Sucha masa 1 brodawki korzeniowej (mg)
30	H <sub>2</sub> O	28,0a*	0,23a	52,5a	1,88bc
	LCOs	36,6ab	0,34bc	61,8b	1,68abc
	Mo	34,0a	0,31b	61,8b	1,81abc
	LCOs+Mo	43,0bc	0,37cd	64,5b	1,49ab
60	H <sub>2</sub> O	36,6ab	0,34bc	70,3c	1,91c
	LCOs	47,0c	0,41de	76,4d	1,64abc
	Mo	43,6bc	0,37cd	75,3d	1,73abc
	LCOs+Mo	54,6d	0,43e	81,2e	1,48a
Średnia dla preparatu	H <sub>2</sub> O	32,3a	0,29a	61,4a	1,90c
	LCOs	41,8b	0,37c	69,1b	1,66ab
	Mo	38,8b	0,34b	68,5b	1,77bc
	LCOs+Mo	48,8c	0,40c	72,8c	1,49a
Średnia dla wilgotności gleby	30% ppw	35,4a	0,31a	60,1a	1,72a
	60% ppw	45,5b	0,39b	75,8b	1,69a
NIR I ( $\alpha=0,05$ )**		3,878	0,024	1,350	0,170
NIR II ( $\alpha=0,05$ )		2,742	0,017	0,954	0,120
NIR I*II ( $\alpha=0,05$ )		5,485	0,034	1,909	0,240

\*Liczby w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy poziomie istotności  $\alpha=0,05$ .

\*\*NIR – najmniejsza istotna różnica między analizowanymi grupami.



preparatu LCOs+Mo było większe niż przyrost świeżej masy tych brodawek na roślinie, co spowodowało zmniejszenie masy pojedynczej brodawki korzeniowej zarówno w fazie wegetacyjnej BBCH 65 jak i BBCH 79.

#### 4.8. Parametry wymiany gazowej

Intensywność fotosyntezy ( $P_n$ ) była determinowana poziomem wilgotności gleby oraz rodzajem preparatu stosowanego przed siewem grochu (tab.15). Wyniki badań wykazały, że stres suszy spowodował spadek wydajności procesu fotosyntezy średnio o 39,8%. Wartość wskaźnika intensywności fotosyntezy ( $P_n$ ) u roślin wyrosłych z nasion zaprawianych roztworem LCOs+Mo (średnio 12,43) była istotnie wyższa od uzyskanego w pozostałych obiektach o 30,8% ( $H_2O$ ), 12,5% (LCOs), i 20,8% (Mo). W warunkach stresu suszy preparat LCOs oraz preparat Mo korzystnie wpływały na wartość wskaźnika  $P_n$  zmniejszając negatywny wpływ deficytu wody na parametry wymiany gazowej. Jednak istotnie wyższą od pozostałych obiektów intensywnością fotosyntezy wyróżniały się rośliny wyrosłe z nasion zaprawianych przed siewem roztworem LCOs+Mo (średnio  $9,56 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) w porównaniu z pozostałymi obiektami. W badaniach stwierdzono, że w optymalnych warunkach wilgotności gleby stosowane preparaty istotnie różnicowały intensywność procesu fotosyntezy. Najwyższą wartość  $P_n$  odnotowano u roślin wyrosłych z nasion zaprawianych przed siewem mieszaniną cząstek sygnałowych LCOs z molibdenem (średnio  $15,30 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Wartość tego parametru była istotnie wyższa od wartości  $P_n$  roślin wyrosłych z nasion zaprawianych wyłącznie czynnikami Nod (średnio 13,56), molibdenem (średnio 12,20) oraz od obiektu kontrolnego (średnio  $11,10 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ).

W prowadzonych badaniach ocenie poddano także wskaźnik intensywności transpiracji ( $E$ ) i wykazano, że stres suszy istotnie obniżył wartość tego parametru (średnio o 49%). W niekorzystnych warunkach środowiska stosowanie preparatów LCOs, Mo oraz LCOs+Mo korzystnie wpłynęło na wielkość tego wskaźnika. W tych warunkach wilgotnościowych intensywność transpiracji była istotnie niższa u roślin z obiektu kontrolnego w porównaniu do tych wartości uzyskanych w pozostałych obiektach. Nie wykazano jednak statystycznie istotnej różnicy pomiędzy działaniem preparatu LCOs, Mo oraz LCOs+Mo w warunkach stresowych tj. niedoboru wody w glebie. W warunkach optymalnej wilgotności gleby najwyższą intensywnością transpiracji wyróżniały się rośliny wyrosłe z nasion zaprawianych preparatem LCOs+Mo (średnio  $3,56 \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Wartość tego parametru była istotnie wyższa od wartości wskaźnika  $E$  w obiektach, w

których do zaprawiania nasion stosowano wyłącznie roztwór czynników Nod (średnio  $3,10 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) lub tylko molibden (średnio  $3,13 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Wyliczony na podstawie parametrów Pn oraz E, wskaźnik wykorzystania wody (WUE) wykazał, że rośliny rosnące w warunkach stresu suszy lepiej gospodarowały zasobami wodnymi w porównaniu do roślin z obiektu, w którym połowa pojemność wodna gleby była utrzymywana na poziomie 60% ppw. Istotnie wyższą wartość parametru WUE w tych warunkach wilgotności gleby uzyskano w obiekcie z roślinami wyrosłymi z nasion zaprawianych przed siewem preparatem LCOs+Mo. Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w działaniu pozostałych preparatów na wartość tego wskaźnika. W warunkach optymalnej wilgotności gleby najniższą wartość parametru WUE odnotowano u roślin wyrosłych z nasion zaprawianych wyłącznie molibdenem (średnio  $3,89 \mu\text{mol CO}_2\cdot\text{mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ). Pozostałe preparaty nie różnicowały istotnie wartości wskaźnika wykorzystania wody.

Deficyt wody spowodował istotny spadek wartości parametru Gs. Przewodność szparkowa u roślin, na które oddziaływał stres suszy miała najmniejszą wartość w obiekcie kontrolnym (średnio  $219 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Wartość ta była istotnie niższa od wartości tego parametru uzyskanego w pozostałych obiektach. Nie wykazano także istotnie statystycznej różnicy między działaniem czynników Nod i molibdenu na przewodność szparkową w roślinach grochu. Najwyższym wskaźnikiem Gs charakteryzowały się rośliny z obiektu zaprawianego roztworem LCOs+Mo (średnio  $269,33 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). W obiektach, w których połowa pojemność wodna była na poziomie 60% ppw, najniższą przewodność szparkową stwierdzono w roślinach traktowanych przedsięwzięciem wodą (obiekt kontrolny) (średnio  $399,33 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) i roślinach wyrosłych z nasion zaprawianych wyłącznie molibdenem (średnio  $414 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Wskaźnik Gs roślin wyrosłych z nasion zaprawianych preparatem LCOs wyniósł  $426 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  i nie różnił się istotnie od wartości parametru Gs roślin wyrosłych z nasion zaprawianych Mo. Najwyższą przewodnością szparkową charakteryzowały się liście roślin grochu, których nasiona zaprawiano przed siewem roztworem cząstek sygnałnych LCOs i molibdenem (średnio  $462 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Tabela 15. Parametry wymiany gazowej roślin grochu w zależności od stosowanych preparatów i wilgotności gleby

Wilgotność gleby (% ppw); (II)	Preparat (I)	Parametry wymiany gazowej			
		Pn ( $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )	E ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )	Gs ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )	WUE ( $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mmol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ )
30	H <sub>2</sub> O	6,10a*	1,20a	219,00a	5,10cd
	LCOs	8,20c	1,70b	251,33b	4,83bcd
	Mo	7,50b	1,63b	241,33b	4,61bc
	LCOs+Mo	9,56d	1,76b	269,33c	5,44d
60	H <sub>2</sub> O	11,10e	2,53c	414,00de	4,42b
	LCOs	13,56g	3,10d	426,33e	4,38b
	Mo	12,20f	3,13d	399,33d	3,89a
	LCOs+Mo	15,30h	3,56e	462,00f	4,29b
Średnia dla preparatu	H <sub>2</sub> O	8,60a	1,86a	316,50a	4,76b
	LCOs	10,88c	2,40b	338,83b	4,61ab
	Mo	9,85b	2,38b	320,33a	4,25a
	LCOs+Mo	12,43d	2,66c	365,66c	4,86b
Średnia dla wilgotności	30% ppw	7,84a	1,57a	245,25a	4,99b
	60% ppw	13,04b	3,08b	425,41b	4,25a
NIR I ( $\alpha=0,05$ )**		0,187	0,196	10,832	0,437
NIR II ( $\alpha=0,05$ )		0,132	0,139	7,659	0,309
NIR I*II ( $\alpha=0,05$ )		0,264	0,278	15,319	0,618

\*Liczby w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy poziomie istotności  $\alpha=0,05$ .

\*\*NIR – najmniejsza istotna różnica między analizowanymi grupami.

#### 4.9. Wskaźniki fluorescencji chlorofilu

Maksymalną wydajność kwantową fotoukładu PSII determinował czynnik stresu suszy. Najniższą wartość wskaźnika Fv/Fm odnotowano dla roślin rosnących na obiekcie kontrolnym w warunkach niedoboru wody (0,80) (tab.16). Stosowane preparaty czynników Nod,

Tabela 16. Wskaźniki fluorescencji chlorofilu w roślinach grochu

Wilgotność gleby (% ppw); (II)	Preparat (I)	Wskaźniki fluorescencji chlorofilu	
		Fv/Fm	PI
30	H <sub>2</sub> O	0,80	4,63a*
	LCOs	0,82	6,01bc
	Mo	0,81	5,18ab
	LCOs+Mo	0,82	6,27bcd
60	H <sub>2</sub> O	0,83	6,19bcd
	LCOs	0,83	7,04cd
	Mo	0,83	6,55cd
	LCOs+Mo	0,84	7,39d
Średnia dla preparatu	H <sub>2</sub> O	0,81	5,59a
	LCOs	0,82	6,53bc
	Mo	0,82	5,69ab
	LCOs+Mo	0,83	6,83c
Średnia dla wilgotności gleby	30% ppw	0,81	5,52a
	60% ppw	0,83	6,79b
NIR I ( $\alpha=0,05$ )**		-	0,919
NIR II ( $\alpha=0,05$ )		-	0,650
NIR I*II ( $\alpha=0,05$ )		-	1,300

\*Liczby w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy poziomie istotności  $\alpha=0,05$ .

\*\*NIR – najmniejsza istotna różnica między analizowanymi grupami.

molibdenu oraz LCOs+Mo redukowały negatywny wpływ deficytu wody w glebie na wydajność fotoukładu PSII. W optymalnych warunkach wilgotności gleby we wszystkich analizowanych obiektach wartość parametru  $F_v/F_m$  wskazywała na prawidłową wydajność kwantową fotoukładu II, z czego najwyższą wartość tego wskaźnika odnotowano u roślin wyrosłych z nasion zaprawianych przed siewem preparatem LCOs+Mo (0,84).

Poziom wilgotności gleby oraz rodzaj stosowanego preparatu miały istotny wpływ na wartość wskaźnika funkcjonowania fotosystemu II (PI). Stres suszy spowodował obniżenie parametru PI we wszystkich analizowanych obiektach w porównaniu do roślin rosnących w warunkach optymalnego uwilgotnienia gleby. Stwierdzono, że rośliny rosnące na obiekcie kontrolnym charakteryzowały się istotnie niższym od pozostałych roślin wskaźnikiem funkcjonowania fotosystemu II (4,63). Preparat zawierający mieszaninę rizobialnych czynników Nod i molibdenu w największym stopniu poprawił funkcjonowanie fotosystemu II ( $F_v/F_m=6,27$ ). W optymalnych warunkach wilgotności gleby wykazano, że we wszystkich analizowanych obiektach żywotność fotosystemu II była prawidłowa, a analizowane preparaty nie spowodowały istotnych wartości wskaźnika PI.

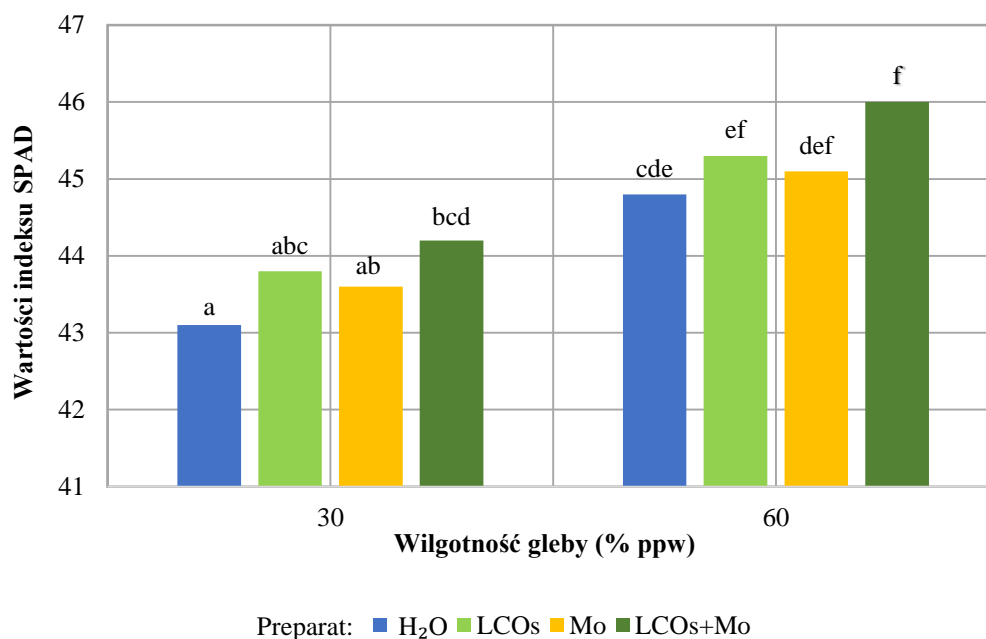
#### **4.10. Indeks zieloności liścia**

Wartość indeksu zieloności liścia zależała od wilgotności gleby oraz rodzaju stosowanego preparatu. W odniesieniu do roślin rosnących w optymalnych warunkach wilgotności gleby stwierdzono największą wartość wskaźnika zieloności liścia. Zawartość tego barwnika w warunkach stresowych była niższa w porównaniu z obiektami o optymalnym uwilgotnieniu gleby (rys.14). Najwyższy indeks zieloności liścia stwierdzono w optymalnych warunkach wilgotności gleby, gdzie uprawiano rośliny wyrosłe z nasion grochu zaprawianych przed siewem preparatem LCOs+Mo.

W warunkach stresu suszy wartość indeksu SPAD była najniższa dla obiektu kontrolnego i wyniosła 43,1. Nie wykazano natomiast istotnej różnicy pomiędzy działaniem preparatów  $H_2O$ , LCOs oraz Mo. Jedynie rośliny wyrosłe z nasion zaprawianych roztworem łączącym czynniki Nod i molibden charakteryzowały się istotnie wyższym indeksem zieloności liścia w porównaniu z obiektem kontrolnym. Nie wykazano jednak istotnej różnicy pomiędzy działaniem preparatu LCOs+Mo a samym molibdenem i czynnikami Nod.

W warunkach optymalnej wilgotności gleby rośliny wyrosłe z nasion zaprawianych preparatem LCOs+Mo charakteryzowały się istotnie wyższym indeksem zieloności liścia (średnio 46,0) w porównaniu z obiektem kontrolnym (średnio 44,8). Nie stwierdzono

natomiast istotnej różnicy między działaniem preparatu czynników Nod, molibdenu oraz LCOs+Mo na względną zawartość chlorofilu w liściach grochu.

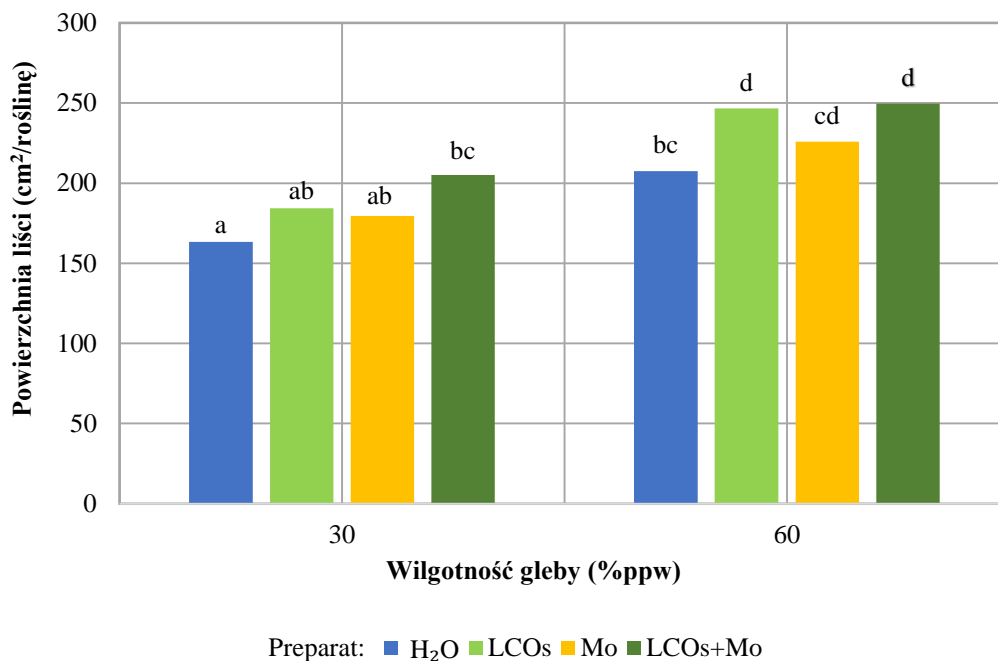


Rys. 14. Wartość indeksu zieloności liścia w fazie kwitnienia (BBCH 65)

#### 4.11. Powierzchnia liści

W warunkach stresu suszy najmniejszą powierzchnię liści grochu odnotowano na obiekcie kontrolnym (średnio 163 cm<sup>2</sup>/roślinę) (rys.15). Nie różniła się jednak ona istotnie od powierzchni liści roślin wyrosłych z nasion zaprawianych wyłącznie preparatem czynników Nod lub molibdenem. Natomiast największą powierzchnię liści wytworzyły rośliny, wyrosłe z nasion zaprawianych preparatem LCOs+Mo (średnio 205 cm<sup>2</sup>/roślinę) i była ona istotnie większa niż u roślin rosnących na obiekcie kontrolnym. Jednakże nie udowodniono istotnych statystycznie różnic między średnią powierzchnią liści roślin rosnących na obiekcie kontrolnym w optymalnych warunkach wilgotnościowych gleby, a powierzchnią liści roślin wyrosłych z nasion zaprawianych preparatem LCOs+Mo i rosnących w warunkach stresu suszy.

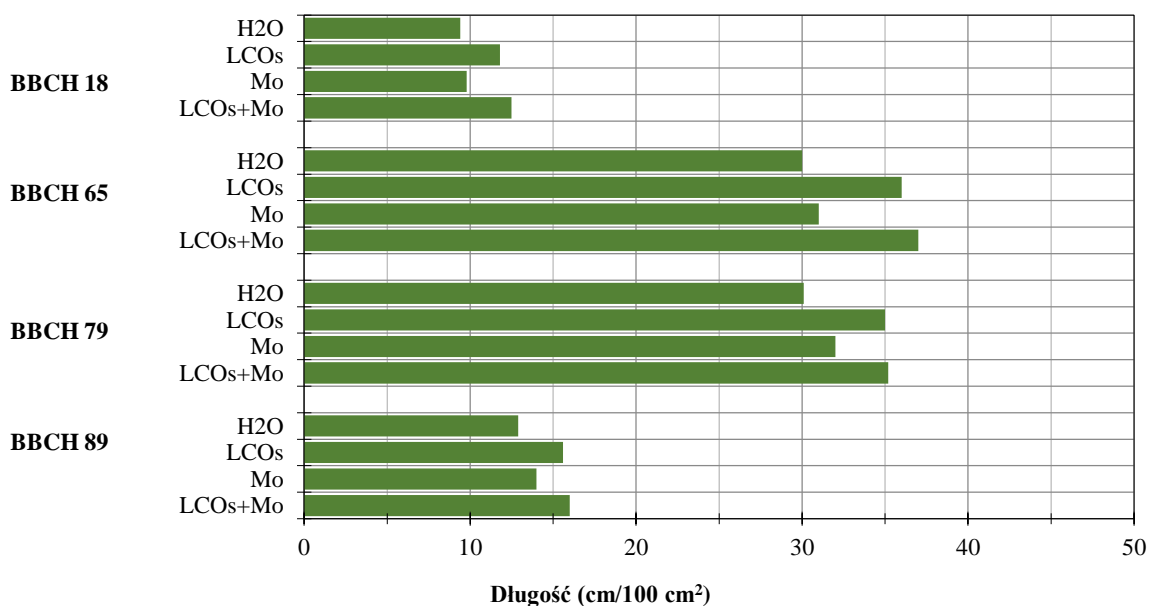
W optymalnych warunkach wilgotności gleby rośliny na obiekcie kontrolnym wytworzyły istotnie mniejszą powierzchnię liści (średnio 208 cm<sup>2</sup>/roślinę) w porównaniu z roślinami z pozostałych obiektów. Największą powierzchnię liści odnotowano u roślin wyrosłych z nasion zaprawianych roztworem LCOs+Mo (średnio 250 cm<sup>2</sup>/roślinę) oraz LCOs (średnio 247 cm<sup>2</sup>/roślinę). Wartości te nie różniły się jednak istotnie od powierzchni liści roślin wyrosłych z nasion zaprawianych wyłącznie molibdenem (średnio 226 cm<sup>2</sup>/roślinę).



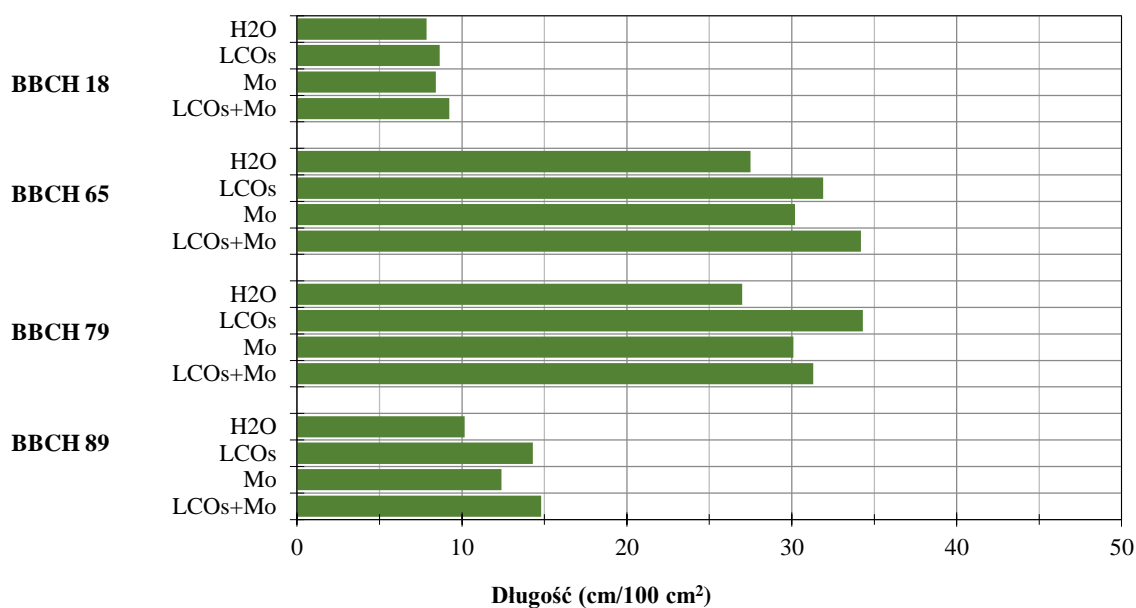
Rys. 15. Powierzchnia liści (cm<sup>2</sup>/roślinę) w fazie kwitnienia (BBCH 65)

#### 4.12. Parametry korzeni

Całkowita długość korzeni roślin zależała między innymi od fazy rozwojowej grochu (rys.16 i 17). Najkrótsze korzenie odnotowano w fazie wegetacyjnej BBCH 18 (średnio 9,7 cm/100cm<sup>2</sup>). Wraz ze wzrostem roślin obserwowano także rozwój ich korzeni. Najdłuższe korzenie groch posiadał w fazie kwitnienia (BBCH 65 - średnio 32,2 cm/100 cm<sup>2</sup>) oraz zielonego strąka (BBCH 79 - średnio 31,8 cm/100 cm<sup>2</sup>), zaś w późniejszych etapach rozwoju



Rys. 16. Całkowita długość korzeni w różnych fazach wzrostu i rozwoju roślin grochu (30% ppw)



Rys. 17. Całkowita długość korzeni w różnych fazach wzrostu i rozwoju roślin grochu (60% ppw)

roślin, ich długość uległa redukcji. Średnia długość korzenia w fazie dojrzałości pełnej wyniosła średnio 13,7 cm/100 cm<sup>2</sup>.

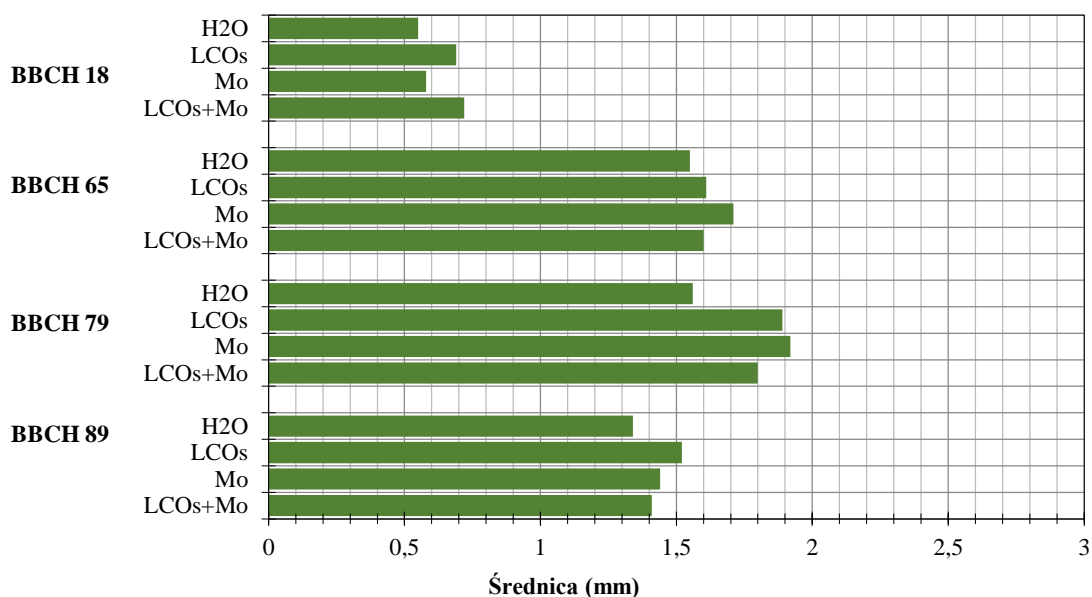
W badaniach wykazano, że wilgotność gleby różnicowała długość korzeni roślin grochu. Deficyt wody w glebie przyczynił się do wzrostu długości korzeni w każdej analizowanej fazie rozwojowej. Korzenie roślin grochu wyrosłych w warunkach stresu suszy w fazie BBCH 18, BBCH 65, BBCH 79 i BBCH 89 były dłuższe od korzeni roślin rosnących w warunkach optymalnych odpowiednio o: 20,9; 7,8; 7,3 i 11,7%.

Długość korzeni roślin grochu determinował również rodzaj stosowanego preparatu. Wykazano, że niezależnie od fazy rozwojowej, zarówno w warunkach stresu suszy jak i w warunkach optymalnego uwilgotnienia gleby najdłuższe korzenie posiadał groch, którego nasiona przed siewem zaprawiane były preparatem czynników Nod oraz preparatem LCOs+Mo. Deficyt wody w glebie spowodował, że w fazie wegetacyjnej BBCH 18 korzenie roślin wyrosłych z nasion zaprawianych preparatem czynników Nod i molibdenem były najdłuższe (średnio 12,5 cm/100 cm<sup>2</sup>) w porównaniu do długości korzeni grochu wyrosłego z nasion zaprawianych tylko preparatem LCOs (średnio 11,8 cm/100 cm<sup>2</sup>), molibdenem (średnio 9,8 cm/100 cm<sup>2</sup>) oraz wodą (średnio 9,4 cm/100 cm<sup>2</sup>). W fazie kwitnienia średnia długość korzeni roślin wyrosłych z nasion zaprawianych preparatem łączącym LCOs i molibden wyniosła 37 cm/100 cm<sup>2</sup> i była dłuższa od korzeni grochu, którego nasiona przedsięwzięcie zaprawiano czynnikami Nod, molibdenem i wodą, odpowiednio o: 2,7; 16,2 i



18,9%. W późniejszych fazach rozwojowych korzenie grochu wyrosłego z nasion zaprawianych preparatem LCOs+Mo również były najdłuższe w porównaniu do reszty analizowanych obiektów, a ich średnia długość wyniosła: 35,2 (BBCH 79) i 16,0 cm/100 cm<sup>2</sup> (BBCH 89). W optymalnych warunkach wilgotności gleby najdłuższe korzenie w fazach wegetacyjnych BBCH 18, BBCH 65 oraz BBCH 89 wykształciły korzenie roślin, których nasiona przed siewem zaprawiano roztworem łączącym czynniki Nod i molibden, a ich średnia długość w tych fazach rozwojowych wyniosła odpowiednio: 9,24; 34,2 i 14,8 cm/100 cm<sup>2</sup>. Z kolei w fazie zielonego strąka (BBCH 79) najdłuższe korzenie wykształcił groch, wyrosły z nasion zaprawianych przedsewnie tylko preparatem czynników Nod (średnio 34,2 cm/100 cm<sup>2</sup>) i były one dłuższe w porównaniu do obiektów, których nasiona zaprawiano preparatem LCOs+Mo, Mo oraz H<sub>2</sub>O odpowiednio o: 8,7; 12,6 i 21,2%.

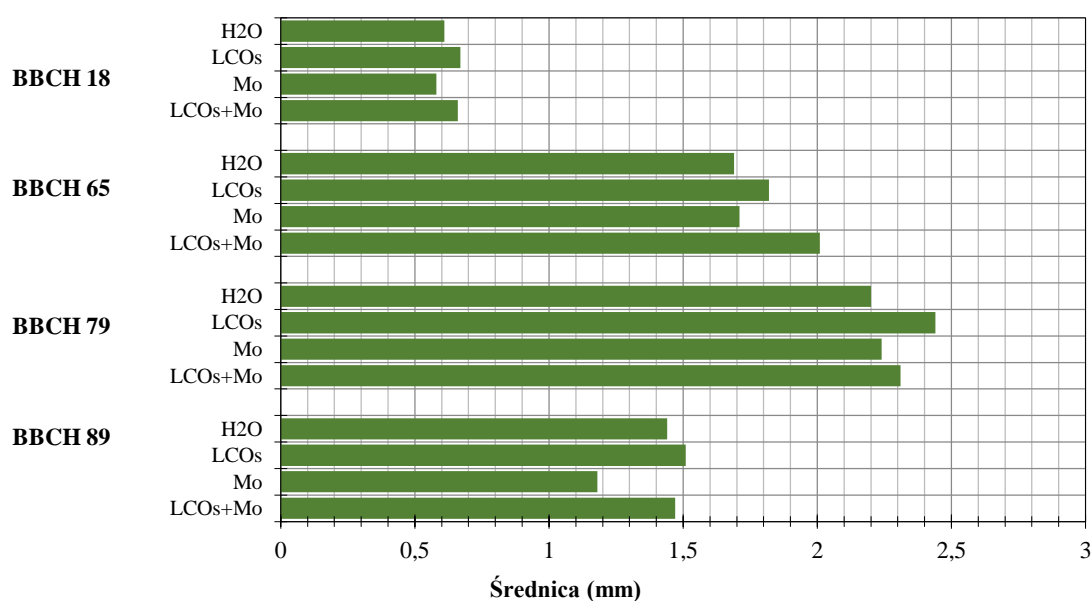
W badaniach wykazano, że przeciętna średnica korzeni roślin grochu zależała od fazy rozwojowej, poziomu polowej pojemności wodnej oraz od rodzaju zastosowanego w doświadczeniu preparatu (rys. 18 i 19). Najmniejszą średnicę korzeni stwierdzono w



Rys. 18. Przeciętna średnica korzeni w różnych fazach wzrostu i rozwoju grochu (30% ppw) początkowej fazy rozwoju roślin (BBCH 18) (średnio 0,63 mm). W kolejnych fazach wegetacyjnych, wraz ze wzrostem długości korzeni zwiększała się również ich średnica. W fazie kwitnienia (BBCH 65) oraz zielonego strąka (BBCH 79) przeciętna średnica korzeni grochu wyniosła odpowiednio: 1,61 (30% ppw) i 1,80 mm (60% ppw) oraz 1,79 (30% ppw) i 2,29 mm (60% ppw). W ostatniej fazie wegetacyjnej (BBCH 89) przeciętna średnica korzeni w warunkach stresu suszy wyniosła 1,42 mm, a w warunkach optymalnych 1,40 mm.

W fazie wegetacyjnej BBCH 18 przeciętna średnica korzeni wyniosła tyle samo zarówno w warunkach stresu suszy jak i w warunkach optymalnego uwilgotnienia gleby (średnio 0,63 mm). W fazie kwitnienia (BBCH 65) oraz zielonego strąka (BBCH 79) większą średnicę korzeni wykształciły rośliny grochu rosnące w optymalnych warunkach wilgotności gleby w porównaniu do roślin wyrosłych w warunkach deficytu wody, odpowiednio o: 10,6 oraz 21,8%. W fazie dojrzałości pełnej (BBCH 89) większą średnicę korzeni wykształciły rośliny poddane stresowi suszy średnio o 1,4% w porównaniu do średnicy korzeni grochu w warunkach optymalnych.

W badaniach wykazano, że rodzaj stosowanego preparatu determinował przeciętną średnicę korzeni roślin grochu. W warunkach niedoboru wody w glebie w fazie rozwojowej BBCH 18 największą średnicę korzeni wykształciły rośliny, wyrosłe z nasion zaprawianych roztworem LCOs+Mo (średnio 0,72 mm). Z kolei w fazie kwitnienia oraz zielonego strąka największą średnicę korzeni stwierdzono u roślin wyrosłych z nasion zaprawianych przedsięwzięciem tylko molibdenem: 1,71 mm (BBCH 65) oraz 1,92 mm (BBCH 79). W fazie dojrzałości pełnej największą średnicę korzeni grochu odnotowano u roślin, wyrosłych z nasion zaprawianych tylko czynnikami Nod (średnio 1,52 mm). W fazach rozwojowych BBCH 18, BBCH 79 oraz BBCH 89, w warunkach optymalnego uwilgotnienia gleby przeciętna średnica korzeni była największa u roślin wyrosłych z nasion zaprawianych tylko rizobialnymi czynnikami Nod. W okresie kwitnienia odnotowano największą średnicę



Rys. 19. Przeciętna średnica korzeni w różnych fazach wzrostu i rozwoju grochu (60% ppw)

korzeni u grochu wyrosłego z nasion zaprawianych roztworem łączącym czynniki Nod i molibden i była ona większa w porównaniu do średnicy korzeni roślin, których nasiona zaprawiano preparatem LCOs, Mo oraz H<sub>2</sub>O odpowiednio o: 9,5; 14,9 oraz 15,9%.

#### **4.13. Plon nasion i elementy jego struktury**

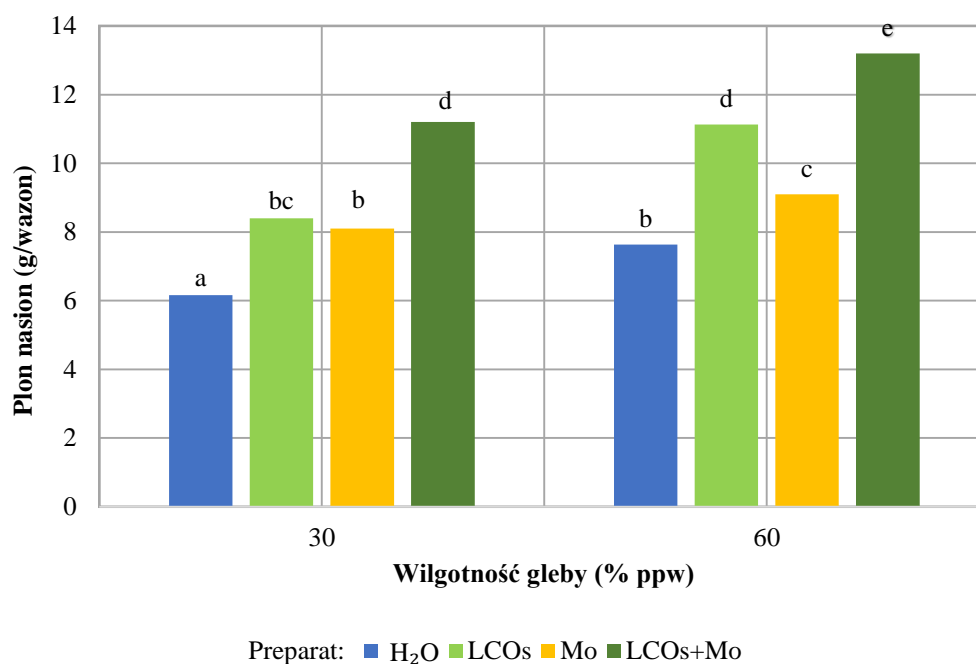
W fazie zielonego strąka wilgotność gleby istotnie różnicowała elementy struktury plonu (tab.17). Wprowadzony deficyt wody w glebie przyczynił się do spadku liczby strąków na roślinie, liczby nasion w strąku, liczby nasion z rośliny i MTN odpowiednio o: 11,9, 12,7, 20,5 i 11,5%. Stres suszy w tej fazie rozwojowej wpłynął również na wysokość plonu nasion (rys.20). Badania wykazały, że w warunkach optymalnych plon nasion grochu był wyższy o 17,6% w porównaniu do plonu nasion uzyskanego w warunkach stresowych. Na elementy struktury plonu istotny wpływ miał także rodzaj zastosowanego preparatu. Rośliny wyrosłe z nasion zaprawianych przed siewem roztworem LCOs+Mo charakteryzowały się istotnie większą wartością elementów struktury plonu, tj.: liczbą strąków na roślinie (średnio 8,10), liczbą nasion w strąku (średnio 3,33) i liczbą nasion z rośliny (średnio 26,50) w porównaniu do wyników uzyskanych w pozostałych obiektach. W badaniach stwierdzono także korzystny i statystycznie istotny wpływ preparatu LCOs i preparatu Mo na wzrost liczby strąków na roślinie, liczby nasion w strąku oraz liczby nasion z rośliny w porównaniu z wartościami tych cech uzyskanymi w obiekcie kontrolnym. Rodzaj stosowanego preparatu miał również wpływ na masę tysiąca nasion. Wykazano, że pomimo zwiększenia liczby strąków na roślinie oraz liczby nasion w strąku, wartość MTN uległa statystycznie istotnemu zmniejszeniu u roślin wyrosłych z nasion zaprawianych LCOs+Mo w porównaniu do pozostałych obiektów. Masa tysiąca nasion roślin wyrosłych z nasion zaprawianych LCOs, Mo oraz z obiektu kontrolnego nie różniła się istotnie. W badaniach wykazano, że rodzaj stosowanego preparatu determinował także plon nasion grochu w fazie zielonego strąka. Stosując przedsięwzięcie roztwór zawierający LCOs+Mo uzyskano istotnie wyższy plon w porównaniu do plonu z pozostałych obiektów. Istotnie wyższy plon nasion stwierdzono w obiektach, gdzie nasiona zaprawiano czynnikami Nod (średnio 9,76 g/wazon) w zestawieniu z plonem roślin z obiektów, gdzie nasiona zaprawiano jedynie molibdenem (średnio 8,60 g/wazon) oraz obiektem kontrolnym (średnio 6,90 g/wazon). W badaniach wykazano, że zarówno w warunkach stresu suszy (średnio 11,20 g/wazon) jak i w warunkach optymalnych (średnio 13,20 g/wazon) istotnie wyższy plon nasion grochu uzyskano od roślin zaprawianych przed siewem preparatem LCOs+Mo w porównaniu do roślin z pozostałych obiektów.

Tabela 17. Elementy struktury plonu nasion grochu w fazie zielonego strąka (BBCH 79) w zależności od zastosowanych czynników

Wilgotność gleby (% ppw); (II)	Preparat (I)	Liczba strąków na roślinie	Liczba nasion w strąku	Liczba nasion z rośliny	Masa 1000 nasion (g)
30	H <sub>2</sub> O	5,43a*	2,70a	19,00a	74,66b
	LCOs	7,16cd	2,86b	22,00b	73,00ab
	Mo	6,99c	2,80ab	22,00b	74,66b
	LCOs+Mo	7,40d	3,20cd	22,3b	72,00a
60	H <sub>2</sub> O	6,00b	3,10c	22,66b	84,00d
	LCOs	7,83e	3,40ef	28,00c	83,66cd
	Mo	7,96e	3,30de	26,00c	83,66cd
	LCOs+Mo	8,80f	3,46f	30,66d	81,33c
Średnia dla preparatu	H <sub>2</sub> O	5,71a	2,90a	20,83a	79,33b
	LCOs	7,50b	3,13b	25,00bc	78,33b
	Mo	7,46b	3,05b	24,00b	79,16b
	LCOs+Mo	8,10c	3,33c	26,50c	76,66a
Średnia dla wilgotności gleby	30% ppw	6,74a	2,89a	21,33a	73,58a
	60% ppw	7,65b	3,31b	26,83b	83,16b
NIR I ( $\alpha=0,05$ )**		0,265	0,111	1,619	1,657
NIR II ( $\alpha=0,05$ )		0,187	0,079	1,144	1,171
NIR III ( $\alpha=0,05$ )		0,375	0,158	2,289	2,343

\*Liczby w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy poziomie istotności  $\alpha=0,05$ .

\*\*NIR – najmniejsza istotna różnica między analizowanymi grupami



Rys. 20. Plon nasion grochu w fazie zielonego strąka

Z przeprowadzonych badań wynika, że stres suszy spowodował także spadek plonu nasion w fazie dojrzałości pełnej grochu średnio o 13,4% (tab.18 i rys.21). W obiektach tych stwierdzono również istotnie niższą liczbę strąków na roślinie, liczbę nasion w strąku, liczbę nasion z rośliny oraz MTN w porównaniu do wymienionych elementów plonu uzyskanych w obiektach o uwilgotnieniu gleby na poziomie 60% ppw. Zastosowanie preparatów LCOs, Mo oraz LCOs+Mo w postaci zaprawy nasiennej przed siewem spowodowało zwiększenie plonu nasion grochu, uprawianego w warunkach stresu suszy, w porównaniu z obiektem kontrolnym odpowiednio o: 27,4; 15,4 i 32,2%. Rodzaj stosowanego preparatu determinował również elementy struktury plonu. Preparat LCOs+Mo istotnie zwiększył liczbę strąków na roślinie oraz liczbę nasion z rośliny w porównaniu z innymi analizowanymi obiektami. Stwierdzono również, że istotnie większą liczbę strąków na roślinie, liczbę nasion w strąku oraz liczbę nasion z rośliny uzyskano w obiekcie, w którym nasiona przed siewem zaprawiano tylko preparatem czynników Nod lub tylko molibdenem w porównaniu do obiektu niezaprawianego.

Zastosowanie preparatów LCOs, Mo oraz LCOs+Mo w postaci zaprawy nasiennej przed siewem spowodowało zwiększenie plonu nasion grochu, uprawianego w optymalnych warunkach wilgotności gleby, w porównaniu z obiektem kontrolnym odpowiednio o: 23,5; 16,9 i 27,7%. Wyższy plon nasion grochu był wynikiem zwiększonej liczby strąków na roślinie, liczby nasion w strąku i liczby nasion z rośliny.

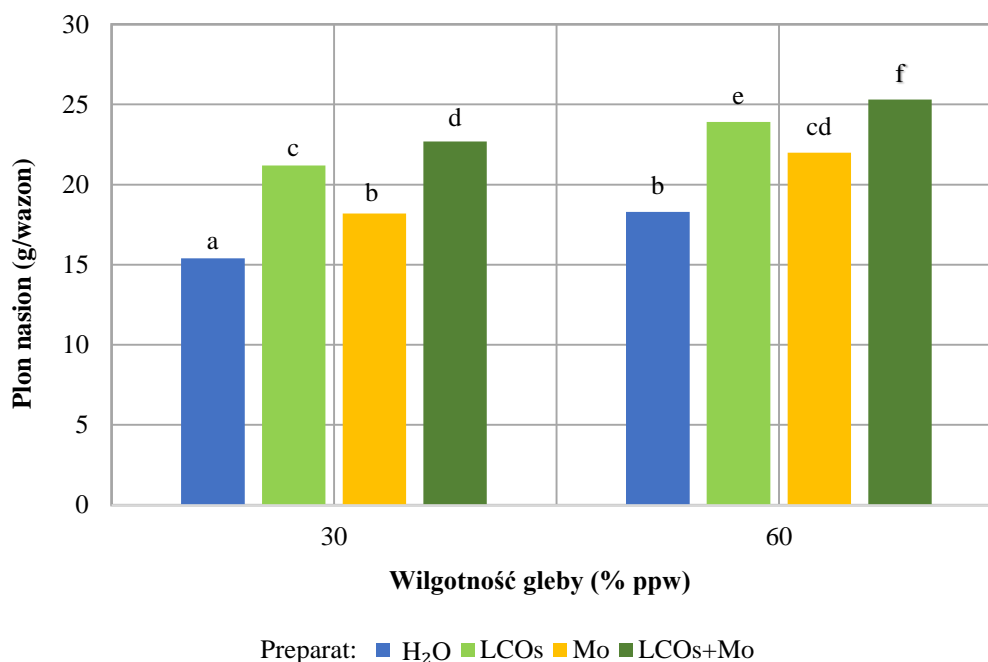
Tabela 18. Elementy struktury plonu nasion grochu w fazie dojrzałości pełnej (BBCH 89)

Wilgotność gleby (%ppw); (II)	Preparat (I)	Liczba strąków na roślinie	Liczba nasion w strąku	Liczba nasion z rośliny	Masa 1000 nasion (g)
30	H <sub>2</sub> O	4,2a*	3,0a	15,6a	220,0ab
	LCOs	5,7c	3,4bc	20,6bc	217,6a
	Mo	5,4b	3,3b	19,0b	217,6a
	LCOs+Mo	6,4d	3,5c	22,6cd	218,3ab
60	H <sub>2</sub> O	5,9c	3,3b	20,0b	226,3c
	LCOs	6,8e	3,8d	24,0d	222,0abc
	Mo	6,7e	3,6c	23,6d	222,3bc
	LCOs+Mo	7,4f	3,8d	27,6e	225,0c
Średnia dla preparatu	H <sub>2</sub> O	5,0a	3,2a	17,8a	223,1b
	LCOs	6,2c	3,6c	22,3b	219,8a
	Mo	6,0b	3,4b	21,3b	220,0ab
	LCOs+Mo	6,9d	3,6c	25,1c	221,6ab
Średnia dla wilgotności gleby	30% ppw	5,4a	3,3a	19,5a	218,4a
	60% ppw	6,7b	3,6b	23,8b	223,9b
NIR I ( $\alpha=0,05$ )**		0,178	0,127	1,478	3,199
NIR II ( $\alpha=0,05$ )		0,126	0,090	1,045	2,262
NIR III ( $\alpha=0,05$ )		0,252	0,180	2,090	4,524

\*Liczby w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy poziomie istotności  $\alpha=0,05$ .

\*\*NIR – najmniejsza istotna różnica między analizowanymi grupami

Odnotowano z kolei mniejszą masę tysiąca nasion w tych obiektach, ale nie wpłynęło to na wielkość plonu. Najwyższy plon nasion uzyskano z roślin wyrosłych z nasion zaprawianych przed siewem preparatem zawierającym mieszaninę cząstek sygnalnych Nod i molibdenu (średnio 25,30 g/wazon) i był on istotnie wyższy od plonu nasion z roślin rosnących na pozostałych obiektach doświadczalnych.



Rys. 21. Plon nasion grochu w fazie dojrzałości pełnej

#### 4.14. Skład chemiczny nasion

Analiza składu chemicznego nasion wykazała, że największą zawartością suchej masy (94,8%) wyróżniały się nasiona pozyskane z roślin uprawianych w obiekcie kontrolnym (tj. zaprawiane H<sub>2</sub>O), w warunkach stresu suszy (tab.19). Nasiona te zawierały najmniejszą zawartość żelaza (67,2 mg/kg) i molibdenu (1,20 mg/kg). Natomiast zawartość białka ogólnego była najwyższa w nasionach zebranych z obiektu, w którym zastosowano preparat czynników Nod lub roztwór LCOs+Mo i utrzymywano stres suszy. Najmniejsze ilości tych składników stwierdzono w nasionach z roślin z obiektu kontrolnego, rosnących w optymalnych warunkach wilgotności gleby (średnio dla białka ogólnego: 21,2%). Średnia zawartość popiołu w nasionach roślin grochu uprawianych w warunkach stresu suszy wyniosła 3,47%, a w warunkach optymalnych 2,60%. Spośród analizowanych nasion najwięcej tłuszczu zawierały nasiona zebrane z obiektu kontrolnego i wilgotności gleby 60% ppw (3,06%). Z kolei najmniejszą zawartością tego składnika charakteryzowały się nasiona

zebrane z roślin wyrosłych z nasion zaprawianych przed siewem wyłącznie molibdenem i uprawianych na glebie o wilgotności 30% ppw (2,51%). Najwięcej włókna surowego zgromadziły nasiona zebrane z roślin z obiektu zaprawianego preparatem LCOs+Mo i wilgotności gleby 30% (8,55%). Z kolei nasiona te charakteryzowały się najniższą zawartością bezazotowych związków wyciągowych (BAW) (61,27%).

Największą zawartość azotu stwierdzono w nasionach pochodzących z obiektów, gdzie nasiona zaprawiano preparatami LCOs (5,50%) oraz LCOs+Mo (5,50%) i utrzymywano stres suszy. Nasiona grochu uzyskane z roślin rosnących w warunkach stresu suszy zawierały więcej fosforu i potasu, niż nasiona z roślin rosnących w optymalnych warunkach wilgotności gleby. Nasiona zebrane z roślin rosnących na obiektach w warunkach stresowych zawierały więcej magnezu od nasion z roślin zebranych z obiektów z wilgotnością gleby 60% ppw, z czego największą zawartość tego pierwiastka stwierdzono w nasionach roślin, gdzie stosowano zaprawę nasienną w postaci preparatu LCOs+Mo. Zawartość siarki była podobna we wszystkich analizowanych nasionach i wyniosła średnio 0,21%. Bez względu na wilgotność gleby, największe ilości żelaza zgromadziły nasiona pochodzące z roślin zaprawianych preparatem czynników Nod. Z kolei najniższą zawartością tego mikroelementu charakteryzowały się nasiona zebrane z roślin rosnących na obiekcie kontrolnym, w warunkach stresu suszy. Nasiona roślin wyrosłych z nasion zaprawianych Mo i rosące w optymalnych warunkach wilgotności gleby charakteryzowały się największą zawartością manganu. Wyniki analizy chemicznej wykazały, że nasiona roślin zaprawianych molibdenem lub preparatem LCOs+Mo rosące w obydwu analizowanych wilgotnościach gleby zawierały więcej Mo w porównaniu z pozostałymi obiektami. Zwiększona zawartość molibdenu w wyżej wymienionych obiektach wynikała z zaprawiania nasion przed siewem tym mikroelementem.



Tabela 19. Skład chemiczny nasion grochu

Preparat	Sucha masa (%)	Białko ogólne (%)	Popiół (%)	Tłuszcz (%)	Włókno surowe (%)	BAW (%)	N (%)	P (%)	K (%)	Mg (%)	S (%)	Fe mg/kg	Mn mg/kg	Mo mg/kg
Wilgotność gleby: 30% ppw														
H <sub>2</sub> O	94,8	22,6	3,50	2,64	8,26	63,00	5,20	0,61	1,53	0,14	0,21	67,2	18,1	1,20
LCOs	93,5	23,5	3,40	2,52	8,24	62,34	5,50	0,60	1,52	0,14	0,23	70,5	16,4	1,20
Mo	94,0	23,0	3,50	2,51	8,37	62,62	5,40	0,62	1,54	0,13	0,22	69,9	17,1	6,30
LCOs+Mo	93,8	24,2	3,50	2,48	8,55	61,27	5,50	0,60	1,54	0,16	0,23	68,9	17,3	7,80
Wilgotność gleby: 60% ppw														
H <sub>2</sub> O	92,1	21,2	3,60	3,06	7,78	64,36	5,00	0,50	1,40	0,12	0,20	67,2	17,8	1,10
LCOs	92,4	22,2	3,60	2,52	8,15	63,53	5,20	0,53	1,40	0,13	0,21	70,5	15,5	1,20
Mo	92,4	21,7	3,60	2,61	7,72	64,37	5,10	0,49	1,40	0,12	0,21	69,9	19,1	5,30
LCOs+Mo	92,5	22,7	3,60	2,54	7,41	63,75	5,20	0,50	1,40	0,12	0,20	68,9	18,6	7,30

## 5. DYSKUSJA

Duży potencjał grochu siewnego (*Pisum sativum* L.) nie jest w pełni wykorzystywany, a jego plony w dalszym ciągu są często niskie i niestabilne na przestrzeni lat. Jednak zarówno groch jak i inne gatunki roślin strączkowych są niezwykle cennym surowcem roślinnym. Ich zdolność do biologicznej redukcji nieprzyswajalnego azotu cząsteczkowego pozwala wprowadzić rocznie do gleby od 139 do 170 mln t azotu, z którego mogą również korzystać inne rośliny (Ishizuka 1992, Martyniuk 2012). Dzięki uprawie roślin strączkowych można znacznie zmniejszyć ilość syntetycznych nawozów mineralnych wprowadzanych do środowiska. Badania z wykorzystaniem znakowanego izotopu azotu wykazały, że stosowanie nawozów azotowych negatywnie wpływa na środowisko (Sebilo i in. 2013). Z kolei zdaniem Smil'a (2011) całkowita rezygnacja z nawożenia N nie pozwoliłaby wyżywić aż 45% ludzkiej populacji. Dlatego tak ważne jest poszukiwanie innych, bardziej naturalnych metod pozwalających na uzyskanie wysokich i dobrych jakościowo plonów z uwzględnieniem zakładanych celów ekonomicznych i ekologicznych.

Niekorzystne warunki środowiska stale wpływają na rośliny powodując pogorszenie ich stanu fizjologicznego i tym samym zmniejszenia ich produktywności (Van Heerden i in. 2007). Wśród stresów oddziałujących na organizmy żywe wyróżnia się stresy biotyczne (tj. choroby i szkodniki) oraz abiotyczne (susza, zasolenie, obecność metali ciężkich, stres świetlny i temperaturowy); (Matysiak i Adamczewski 2009). Spośród nich susza stanowi jeden z głównych i powszechnie występujących w świecie, czynników zaburzających prawidłowy wzrost i rozwój roślin (Van Heerden i in. 2007). Niedobór wody w środowisku przyczynia się do pogorszenia stosunków wodnych w roślinie, obniżenia transpiracji i wydajności fotosyntezy i tym samym ograniczeniem rozwoju oraz możliwości plonotwórczych roślin. Wszystkie niekorzystne zmiany zachodzące w metabolizmie roślin powodują zahamowanie ich wzrostu, rozwoju i tym samym spadku plonu (Olszewski i in. 2007, Lamaoui i in. 2018, Sallam i in. 2019). Wykazano, że w ciągu roku stres suszy u roślin uprawnych może obniżać ich plon o około 10-20% (Lesk i in. 2016). Problem związany z niedoborem wody w środowisku narasta w świecie od wielu lat (Kollist i in. 2019), dlatego też w hodowli roślin ciągle poszukuje się nowych, bardziej odpornych odmian, które mogą przyczynić się do prowadzenia produkcji roślinnej nawet w warunkach o obniżonym dostępie wody.

Groch siewny należy do roślin o umiarkowanym zapotrzebowaniu na wodę. Jednak niedostateczna ilość opadów, a zwłaszcza ich nierównomierny rozkład w okresie wegetacji,

szczególnie w najważniejszych okresach wzrostu i rozwoju roślin, jest główną przyczyną zarówno niskich jak i zróżnicowanych na przestrzeni lat plonów nasion (Podleśny 2008, Podleśny i Podleśna 2010, Woźniak 2013). Odpowiednia ilość i rozkład opadów mogą nawet w 80% determinować plon nasion grochu (Grabowska i Banaszkiewicz 2009). Najwięcej wody rośliny pobierają w fazie kiełkowania nasion, kwitnienia oraz zawiązywania strąków, natomiast nadmiar wody w fazie dojrzewania strąków i nasion oraz zamierania roślin przyczynia się do przedłużenia okresu wegetacyjnego oraz silniejszego wylegania roślin utrudniającego ich zbiór. Z kolei kiełkujące nasiona grochu mogą pobierać wodę w ilości stanowiącej od 67 do 125 % ich masy (Kotecki i Kozak 2020). Po wchłonięciu niezbędnych ilości wody następuje faza pęcznienia nasion, w której zachodzą procesy fizjologiczne i metaboliczne (Gujjaiah i Kumari 2013). Niekorzystne warunki pogodowe oraz zbyt niska lub zbyt wysoka wilgotność powietrza są również przyczyną występowania w glebie patogenów wywołujących liczne choroby grochu np. askochytozę (Zalewski i in. 2003). W badaniach własnych wykazano, że zapotrzebowanie grochu na wodę zależało od fazy rozwojowej roślin oraz od temperatury powietrza. Niezależnie od poziomu wilgotności gleby groch pobierał najwięcej wody w fazie kwitnienia oraz zawiązywania strąków, a najmniej w okresie dojrzewania nasion. W 2020 roku średnia dobową temperatura powietrza w okresie kwitnienia roślin była wyższa w porównaniu z drugim rokiem badań, dlatego też w pierwszym roku odnotowano zwiększone zapotrzebowanie roślin na wodę. Z kolei w fazie zawiązywania strąków średnia dobową temperatura powietrza była wyższa w 2021 roku co powodowało zwiększone zapotrzebowanie roślin na wodę w tym roku w porównaniu z pierwszym rokiem badań. W badaniach Podleśnego i Bieniaszewskiego (2012) wykazano, że deficyt wody w najważniejszych okresach wzrostu i rozwoju roślin powodował obniżenie plonu nasion roślin grochu w porównaniu z plonem roślin uprawianych w warunkach większych opadów atmosferycznych.

Wysokiej jakości materiał siewny wpływa na produktywność roślin uprawnych warunkując zarówno wyższą wielkość jak i jakość plonów (Kotecki i Kozak 2020). Dlatego też stosowanie kwalifikowanego materiału siewnego jest ważnym elementem w produkcji roślinnej. Ponadto wysoka jakość nasion jest skorelowana ze wschodami roślin, a kiełkowanie nasion uznawane jest za istotny etap w życiu roślin, ponieważ determinuje ich dalszy wzrost, rozwój i plonowanie (Gujjaiah i Kumari 2013).

Zdaniem Leibovitch i in. (2001) czynniki Nod korzystnie wpływają na wzrost i rozwój roślin już w ich początkowych fazach rozwoju. Częstki sygnałne LCOs stosowane w odpowiednim stężeniu w postaci zaprawy nasiennej przyspieszają kiełkowanie nasion nie

tylko roślin motylkowatych, ale również niemotylkowatych takich jak bawełna czy kukurydza (Prithviraj i in. 2003). W badaniach własnych stwierdzono bardzo dobre wschody roślin we wszystkich analizowanych obiektach, ale najlepszy efekt uzyskano stosując roztwór łączący preparaty LCOs i Mo, a następnie preparat czynników Nod i molibden. Wymienione preparaty dodatkowo poprawiły dynamikę wschodów pomiędzy 5 a 7 dniem od siewu. Badania różnych autorów dowodzą, że cząstki sygnałne Nod wpływają korzystnie na dynamikę wschodów roślin, szczególnie w przypadku niedoboru wody w glebie bądź zbyt niskiej temperatury w czasie kiełkowania nasion (Begum i in. 2001, Kidaj i in. 2012). Pozytywny wpływ zaprawiania nasion preparatem zawierającym czynniki Nod na dynamikę wschodów roślin grochu wykazano również w optymalnych warunkach wilgotności gleby. Badania dowiodły, że preparat zawierający LCOs przyspieszył kiełkowanie nasion i polepszył równomierność wschodów (Podleśny i in. 2013a, Podleśny i in. 2013b, Podleśny i in. 2014). Z kolei odmienne wyniki badań uzyskali Pudełko i in. (2017), którzy nie odnotowali korzystnego wpływu czynników Nod na wschody łubinu wąskolistnego w warunkach doświadczeń polowych.

W niekorzystnych warunkach środowiska rośliny uruchamiają mechanizmy, które odpowiedzialne są za ich obronę przed działającym czynnikiem stresowym. W przypadku niedoboru wody w glebie rośliny zamykają aparaty szparkowe w celu ograniczenia strat wody. W wyniku tego dochodzi do zakłócenia prawidłowego przebiegu procesu fotosyntezy i tym samym ograniczenia wzrostu roślin, osłabienia ich rozwoju i zmniejszenia masy poszczególnych organów (Lamaoui i in. 2018). W badaniach własnych wykazano, że stres suszy miał wpływ na wzrost roślin we wszystkich analizowanych fazach fenologicznych grochu. Groch rosnący w warunkach stresu suszy był istotnie niższy od roślin rosnących w optymalnych warunkach wilgotności gleby. Znajduje to potwierdzenie także w badaniach innych autorów, którzy dowodzą, że susza ogranicza wysokość roślin grochu (Bodah i in. 2015, Osman 2015). W badaniach własnych stwierdzono również korzystny wpływ preparatu czynników Nod, molibdenu oraz roztworu LCOs+Mo na długość łodyg. Z badań wynika, że analizowane preparaty determinowały wzrost roślin grochu zarówno w warunkach stresu suszy jak i w warunkach optymalnego uwilgotnienia gleby. Odnotowano również ważne spostrzeżenie, że wraz ze wzrostem wysokości roślin wydłużała się część łodygi ze strąkami, wskaźnika mającego związek z poziomem plonowania grochu. Istotnie krótszą część łodygi ze strąkami posiadał groch rosnący w warunkach deficytu wody w glebie. Wykazano także, że preparat zawierający mieszaninę rizobialnych czynników Nod

oraz molibdenu istotnie zwiększał długość łodygi ze strąkami, zwłaszcza u roślin rosnących w warunkach optymalnych.

Niedostateczna ilość opadów atmosferycznych znacznie ogranicza wzrost roślin oraz rozwój ich części nadziemnych. W odpowiedzi na stres suszy rośliny uruchamiają mechanizmy obronne przed szkodliwym działaniem czynnika stresowego. Niedobór niezbędnej wody hamuje produkcję komórek, która prowadzi do wytwarzania przez rośliny mniejszej biomasy (Olszewski i in. 2007, Forouzesi i in. 2013). W badaniach własnych stwierdzono, że preparat czynników Nod, molibden oraz roztwór łączący obydwie te substancje zwiększały wartość wskaźnika bezwzględnej szybkości wzrostu roślin (GR). Analizowane preparaty spowodowały zwiększenie przyrostu masy części nadziemnych w fazie kwitnienia, zielonego strąka oraz dojrzałości pełnej zarówno w warunkach stresu suszy jak i w warunkach optymalnego uwilgotnienia gleby. W badaniach własnych stwierdzono również, że we wszystkich analizowanych fazach rozwojowych wskaźnik GR dla korzeni grochu był wyższy u roślin rosnących w warunkach stresowych. Zjawisko to związane jest z reakcją obronną roślin na stres suszy, które w sytuacji deficytu wody w glebie uruchamiają jeden ze swoich mechanizmów pozwalających na wytworzenie dłuższego systemu korzeniowego w celu zwiększenia możliwości dotarcia do zasobów wodnych (Martignago i in. 2020). Niezależnie od poziomu wilgotności gleby masa korzeni grochu zwiększała się jedynie do fazy wegetacyjnej BBCH 79, a w ostatniej fazie rozwojowej BBCH 89 odnotowano jej ubytek. Przyczyną tego zjawiska był proces zamierania i rozkładu części starych korzeni oraz brodawek korzeniowych (Wojcieszka i in. 1993).

Spośród roślin strączkowych duży potencjał wiązania azotu atmosferycznego ma groch, który dzięki symbiozie z bakteriami z rodzaju *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* w ciągu roku może związać średnio 150 kg/ha N<sub>2</sub>, a jego możliwości wynoszą nawet do 244 kg/ha N<sub>2</sub> (Martyniuk 2008). Molibden należy do mikroelementów pełniących istotną rolę w procesie redukcji niereaktywnego azotu cząsteczkowego, ponieważ wchodzi w skład jednego z ważnych komponentów białkowych, tj. enzymu nitrogenazy (Seefeldt i in. 2009). Dlatego też ilość tego pierwiastka w brodawkach jest około 10 razy większa niż w innych częściach rośliny (Bochniarz i in. 1987). Deficyt molibdenu w glebie oraz niekorzystne warunki siedliska (stres suszy) ograniczają intensywność wiązania N<sub>2</sub> przez rośliny. Niektóre gatunki roślin strączkowych mogą związać w wyniku biologicznej redukcji azotu atmosferycznego około 60% całkowitej ilości N pobranego z różnych źródeł. Z kolei deficyt wody powoduje obniżenie redukcji azotu atmosferycznego przez rośliny, a dodatkowo zbyt niska zawartość molibdenu w glebie może zmniejszyć ilość przekształconego azotu nawet

do kilku kg/ha N (Carranca i in. 1999). W badaniach własnych oceniano wskaźniki biologicznego wiązania azotu i wykazano, że korzystny wpływ na liczbę i masę brodawek korzeniowych miało zastosowanie preparatów LCOs, Mo oraz LCOs+Mo. Z czego najlepsze efekty uzyskano stosując preparat LCOs+Mo. Stwierdzono również, że w wyniku stosowania analizowanych preparatów zwiększyła się masa brodawek korzeniowych na roślinie, ale jednocześnie masa pojedynczej brodawki była mniejsza w porównaniu z obiektem kontrolnym. Wyniki badań wskazują, że wymienione powyżej preparaty stymulują aktywność enzymu katalizującego reakcję redukcji azotu cząsteczkowego. W fazie zielonego strąka, w porównaniu z fazą kwitnienia BBCH 65, liczba brodawek korzeniowych we wszystkich analizowanych obiektach uległa redukcji, natomiast ich masa na roślinie była większa. Zjawisko to jest powiązane z typem brodawek jakie posiada groch siewny. Roślina ta wytwarza na korzeniach brodawki niezdeterminowane (nieograniczone), które charakteryzują się powiększonymi bakteroidami i trwałym merystemem, którego stała aktywność pozwala na produkcję nowych komórek w brodawkach, przez co ich rozmiar i masa ulega zwiększeniu (Timmers i in. 2000, Barnett i Fisher 2006). Wyniki badań własnych wykazały, że stres suszy hamował produkcję brodawek korzeniowych grochu, co przełożyło się również na niższą masę brodawek z rośliny. Intensywność procesu brodawkowania zależy od wielu czynników, w tym m.in. od intensywności fotosyntezy. W wyniku deficytu wody w glebie, również proces wymiany gazowej u roślin grochu może być zakłócony (Mengel 1994). W związku z tym otrzymano mniejszą liczbę brodawek na korzeniach roślin rozwijających się w warunkach stresu suszy w porównaniu do obiektów, w których utrzymywano optymalne warunki wilgotnościowe. W badaniach własnych wykazano, że w warunkach stresu suszy w fazie kwitnienia preparat LCOs+Mo istotnie zwiększył liczbę brodawek korzeniowych w porównaniu do obiektów, w których stosowano tylko czynniki Nod, molibden lub wodę, odpowiednio o: 12,9; 16,2 i 27,3%. W tych warunkach wilgotnościowych stwierdzono również istotnie większą liczbę brodawek na korzeniach w obiektach, w których stosowano tylko preparat czynników Nod (średnio 60,6) w porównaniu do liczby brodawek korzeniowych w obiektach kontrolnych (50,6). W optymalnych warunkach wilgotności gleby istotnie większą liczbę brodawek korzeniowych uzyskano w obiektach, w których nasiona przed siewem zaprawiano roztworem LCOs+Mo w porównaniu do pozostałych obiektów. Nie wykazano z kolei istotnej różnicy w działaniu preparatów LCOs, Mo oraz H<sub>2</sub>O na przyrost liczby brodawek korzeniowych.

Najistotniejszym procesem warunkującym życie na ziemi jest fotosynteza. U roślin produkcja związków organicznych z wykorzystaniem dwutlenku węgla, wody oraz energii

słonecznej zachodzi w chloroplastach w dwóch fazach: ciemniowej oraz świetlnej (Kalaji i Łoboda 2010) (z udziałem fotoukładów PSI oraz PSII); (Duysens i in. 1961). Intensywność fotosyntezy zależy m.in. od gatunku rośliny i warunków siedliska (Olszewska i in. 2010), a wydajność tego procesu ma znaczący wpływ na wzrost, rozwój i produktywność roślin uprawnych (Pan i in. 2012). Czynniki stresowe (np. stres suszy) powoduje zaburzenia w wydzielaniu kwasu abscysynowego (ABA), który jest odpowiedzialny za regulację mechanizmu działania aparatów szparkowych. Obrona organizmów przed działaniem stresora polega na zamknięciu aparatów szparkowych, które jest następstwem akumulacji nadmiernej ilości ABA, a w konsekwencji prowadzi do znacznego ograniczenia intensywności transpiracji i wydajności fotosyntezy (Brestic i Zivcak 2013). W badaniach Flexas i Medrano (2002) wykazano, że stres suszy u winorośli spowodował przymknięcie aparatów szparkowych, które z kolei było przyczyną spadku intensywności fotosyntezy aż o 54%. Wskaźnik transpiracji jest silnie, dodatnio skorelowany z intensywnością fotosyntezy i ulega znacznej redukcji w przypadku wystąpienia suszy (Zbieć i in. 1998, Olszewska i in. 2010, Kocoń i Podleśna 2004). W badaniach własnych wykazano, że stres suszy istotnie różnicował parametry wymiany gazowej ( $P_n$ ,  $E$ ,  $G_s$ ) liści grochu siewnego. Deficyt wody spowodował znaczny spadek wydajności fotosyntezy, intensywności transpiracji oraz przewodności szparkowej, a w konsekwencji przyczynił się do wytworzenia przez rośliny mniejszej powierzchni liściowej. Najwyższe parametry wymiany gazowej w porównaniu z obiektem kontrolnym odnotowano u roślin wyrosłych z nasion zaprawianych preparatem LCOs+Mo lub samym roztworem LCOs. W badaniach własnych oceniano również fotosyntetyczny współczynnik wykorzystania wody (WUE), na który wpływa wartość parametru transpiracji. Wykazano, że stres suszy istotnie determinował wartość WUE. Rośliny grochu poddane działaniu czynnika stresowego charakteryzowały się istotnie wyższymi wartościami wskaźnika wykorzystania wody niż rośliny rosnące w optymalnych warunkach wilgotności gleby, co wskazuje na to, że rośliny poddane działaniu czynnika stresu suszy mogą lepiej gospodarować zasobami wodnymi. Podobne wyniki badań prezentują również inni autorzy (Olszewska i in. 2010, Rumaszk-Rudnicka 2010). Z kolei w badaniach ze słonecznikiem, uprawianym w warunkach stresu suszy wykazano zarówno spadek wartości potencjału wodnego, asymilacji  $CO_2$  jak i przewodności szparkowej (Kalaji i Łoboda 2010). W badaniach własnych wykazano, że analizowane preparaty zwiększały intensywność fotosyntezy, transpiracji oraz przewodność szparkową, z czego najlepsze efekty uzyskano stosując zaprawę nasienną LCOs+Mo.

Niekorzystne warunki środowiska (np. susza, zasolenie, stres chłodu) negatywnie oddziałują na rozwój roślin, zaburzając ich prawidłowe funkcjonowanie. Pomiar fluorescencji chlorofilu pozwala na ocenę „kondycji roślin” roślin oraz ewentualny stopień ich uszkodzenia wywołany działaniem stresogennego czynnika. Wyniki badań własnych wykazały, że pod wpływem deficytu wody w glebie istotnie zmniejszyła się wartość parametru  $F_v/F_m$ , który jest miernikiem aktywności aparatu fotosyntetycznego. W optymalnych warunkach rozwoju roślin maksymalna wartość tego wskaźnika wynosi 0,83 i świadczy o prawidłowym, nieszkodzonym aparacie fotosyntetycznym (Kalaji i Łoboda 2010). Obniżoną wartość parametru odnotowuje się tylko w niekorzystnych dla roślin warunkach środowiska (np. długotrwała susza), ponieważ fotoukład II jest dość odporny na niedobór wody w glebie. Potwierdzają to badania na przykładzie wspanięgi (*Vigna unguiculata*), u której maksymalna fotochemiczna wydajność PSII obniżyła się dopiero w zaawansowanej fazie stresu suszy (Souza i in. 2004). Spadek wartości parametru  $F_v/F_m$  poniżej 0,83 wskazuje na zakłócone funkcjonowanie PSII i tym samym spadek intensywności oraz wydajności fotosyntezy (He i in. 1996). Z kolei w innych badaniach wykazano, że aparat fotosyntetyczny roślin jest odporny na stres suszy, a uszkodzenie mechanizmu jego fotoukładu i tym samym obniżenie wartości parametru  $F_v/F_m$  jest istotne jedynie przy 30% niedoborze wody w liściach (Kraiser i in. 2011). W badaniach własnych stwierdzono, że u roślin poddanych stresowi suszy średnia wartość tego parametru wynosiła 0,81 co wynika ze spadku wydajności fotosystemu II. Najwyższą wartość tego wskaźnika uzyskano w obiektach zaprawianych przedsewnie preparatem czynników Nod oraz LCOs+Mo. Wyniki badań własnych wskazują na zaburzoną fotochemiczną wydajność fotoukładu PSII u roślin, na które wpływał czynnik stresu suszy. W pracy oceniono także wskaźnik funkcjonowania fotoukładu II fotosyntezy (ang. PI – *Performance Index*), który jest dodatnio skorelowany z zasobami wodnymi dostępnymi dla roślin. Dlatego też im większa dostępność wody tym wartość tego wskaźnika jest wyższa (Van Heerden i in. 2007). Badania wykazały, że deficyt wody w glebie istotnie obniżył wartość PI, co świadczy o zaburzonej aktywności i sprawności procesu fotosyntezy u roślin poddanych stresowi suszy. Stwierdzono, że zarówno w optymalnych jak i niekorzystnych warunkach wzrostu i rozwoju najwyższymi wartościami tego wskaźnika charakteryzowały się rośliny wyrosłe z nasion zaprawianych przedsewnie preparatem zawierającym mieszaninę czynników Nod i molibdenu.

U roślin wyższych najważniejszymi barwnikami fotosyntetycznymi są chlorofile. Ich obecność determinuje zieloną barwę roślin. Związki te oddziałują na intensywność i



wydajność fotosyntezy pośrednicząc przy tym w produkcji biomasy roślinnej (Olszewska i in. 2010). Wykazano, że stan odżywienia roślin azotem jest skorelowany z intensywnością zielonej barwy blaszek liściowych. Oceny odżywienia roślin azotem można dokonywać za pomocą testu SPAD, który wykrywa niedobory tego pierwiastka objawiające się najczęściej jaśniejszymi liśćmi (Samborski i Rozbicki 2002). Wyniki badań własnych, w których wykorzystano miernik chlorofilu SPAD-502 dowiodły, że liście grochu rozwijającego się w warunkach stresu suszy charakteryzowały się istotnie niższym indeksem SPAD. Deficyt wody spowodował zmniejszenie zawartości chlorofilu w blaszkach liściowych (średnio o 9,3%), co świadczy o słabszym odżywieniu azotem roślin rosnących w warunkach niedoboru wody w glebie w porównaniu do roślin rosnących w warunkach optymalnego uwilgotnienia. Uzyskane wyniki badań własnych korespondują z rezultatami badań Podleśnego i Podleśnej (2010), którzy analizowali wpływ stresu suszy na wzrost, rozwój i plonowanie łubinu wąskolistnego oraz jęczmienia. Autorzy wykazali, że niekorzystne warunki środowiska spowodowały zmniejszenie wartości SPAD u obydwu uwzględnionych w badaniach gatunków roślin. Niższy indeks zieloności liścia u roślin poddanych stresowi suszy jest wynikiem zakłóconej syntezy chlorofilu *a* i *b* spowodowanej niedobrem wody w glebie (Sayed 2003). Z kolei odmienne wyniki badań prezentują inni autorzy, którzy stwierdzili, że deficyt wody spowodował wzrost wartości wskaźnika testu SPAD (Olszewska i in. 2010, Rumasz-Rudnicka 2010). Przyczyną tego zjawiska może być reakcja obronna roślin przed niekorzystnymi warunkami środowiska. Niedobór wody w glebie powoduje ograniczony wzrost organów i zagęszczenia tkanek roślinnych, co z kolei przyczynia się do nadmiernej akumulacji wielu związków, w tym także chlorofilu (Kacperska 1998). W badaniach własnych stwierdzono, że preparat czynników Nod oraz LCOs+Mo spowodowały zwiększenie indeksu zieloności liścia niezależnie od poziomu wilgotności gleby.

Groch siewny jest jednym z najczęściej uprawianych gatunków roślin strączkowych w Polsce. Pomimo wysokiego potencjału plonotwórczego (Podleśny i Podleśna 2012) plony grochu są niestabilne na przestrzeni lat. Najczęściej jest to spowodowane wrażliwością tej rośliny na deficyt wody w glebie, dlatego też prowadzone są liczne prace hodowlane stawiające za cel złagodzenie niekorzystnej reakcji na ten czynnik i w efekcie utrzymanie zadawalającego poziomu plonowania tego gatunku (Wenda-Piesik 2011). Wysokość i jakość plonu jest składową czynników zarówno genetycznych (nowe odmiany), środowiskowych jak i agrotechnicznych. Nierównomierne opady, ich nadmiar lub deficyt oraz czas trwania suszy determinują wiele cech morfologicznych roślin wpływając jednocześnie na ich plon (Carranca i in. 1999, Woźniak 2013, Puczel i Borusiewicz 2014).

Zniżka plonu nasion w niekorzystnych warunkach środowiska jest następstwem zaburzeń wielu procesów metabolicznych, w tym fotosyntezy i w konsekwencji zahamowania wzrostu i rozwoju roślin (Starck 2007, Kocoń i Podleśna 2004).

W badaniach własnych wykazano, że w optymalnych warunkach wilgotności gleby najwyższy plon uzyskano z roślin wyrosłych z nasion zaprawianych preparatem LCOs+Mo, a najniższy wynik odnotowano na obiekcie kontrolnym. Wykazano, że stres suszy istotnie determinował wielkość plonu nasion grochu. W porównaniu z plonem roślin rosnących w optymalnych warunkach wilgotności gleby, pod wpływem czynnika stresu suszy odnotowano zmniejszenie plonu o: 17 (obiekt kontrolny), 15 (molibden) i 13% (czynniki Nod). Stwierdzono, że w wyniku deficytu wody w glebie redukcja plonu roślin wyrosłych z nasion zaprawianych roztworem czynników Nod i molibdenu była najniższa i wyniosła 10%. Z kolei w badaniach Podleśnej (2008) spadek plonu nasion grochu w warunkach niedoboru wody w glebie w fazie kwitnienia roślin wyniósł 46%.

W badaniach własnych zarówno w warunkach optymalnych jak i w warunkach stresu suszy najwyższy plon uzyskano z obiektu zaprawianego LCOs+Mo. Przyrost plonu był spowodowany większą liczbą strąków na roślinie oraz większą liczbą nasion z rośliny. Stwierdzono natomiast spadek masy 1000 nasion w porównaniu z obiektem kontrolnym, jednak parametr ten nie miał znaczącego wpływu na ostateczną wielkość plonu nasion. Zależność ta jest na ogół znana, bowiem wytworzeniu większej liczby nasion na roślinie towarzyszy często zmniejszenie masy pojedynczego nasienia.

Rośliny strączkowe są niezwykle cenne m.in. ze względu na skład chemiczny nasion. Spośród wszystkich roślin uprawnych wyróżniają się one najwyższą zawartością dobrego jakościowo białka, które determinuje ogólną wartość nasion. Dlatego też, nasiona roślin bobowatych uznawane są za bardzo ważny składnik w żywieniu zarówno człowieka jak i zwierząt. Na skład chemiczny nasion wpływa wiele czynników genetycznych i środowiskowych. Zawartość białka jest zależna m.in. od warunków pogodowych (natężenia światła oraz temperatury); (Kotecki i Kozak 2020). Spośród wszystkich gatunków roślin strączkowych uprawianych na terenie Polski, groch siewny należy do roślin o największej zmienności fluktuacyjnej i genetycznej względem zawartości białka w nasionach (Kapusta 2012). Zawartość tego składnika w nasionach grochu wynosi od 180 do 230 g/kg. Z kolei Kotlarz i in. (2011) podają, że zawartość tego składnika w nasionach grochu powinna wynosić od 22,4 do 26%. Wykazano, że pomiędzy plonem nasion a zawartością białka występuje ujemna korelacja (Kotecki i Kozak 2020). W badaniach własnych oceniono skład chemiczny nasion grochu. Analiza wykazała, że w warunkach stresu suszy i w optymalnych

warunkach uwilgotnienia gleby najwyższą zawartością białka ogólnego w nasionach charakteryzowały się nasiona pochodzące z roślin zaprawianych przed siewem preparatem czynników Nod oraz preparatem LCOs+Mo.

Od wielu lat naukowcy badają zjawisko symbiozy pomiędzy bakteriami brodawkowymi i roślinami strączkowymi. Odkrycie mechanizmu tego procesu pozwoliło na identyfikację specyficznych metabolitów wydzielanych przez obydwu partnerów oraz możliwość ingerencji w ich wymianę. Pierwsze badania miały na celu poprawę syntezy cząstek sygnałnych Nod poprzez ich stymulację roślinnymi flawonoidami. Z powodu zbyt szybkiej degradacji roślinnych metabolitów w ryzosferze zaczęto poszukiwać innych rozwiązań mających na celu poprawę procesu brodawkowania poprzez intensyfikację syntezy bakteryjnych cząstek sygnałnych Nod (Zhang i Smith 1995, Begum i in. 2001, Novák i in. 2002). Badania różnych autorów potwierdziły korzystny wpływ rizobialnych czynników LCOs stosowanych w postaci zaprawy nasiennej na cechy biometryczne, brodawkowanie i plonowanie roślin strączkowych (Maj i in. 2010, Smytkiewicz i in. 2021). Wykazano, że omawiane preparaty stosowane w formie zaprawy nasiennej pozytywnie wpływają na dynamikę wschodów roślin, ich wzrost, parametry wymiany gazowej, brodawkowanie oraz plon i elementy struktury. Ich dodatnie działanie odnotowano również w warunkach stresu suszy co sugeruje, że preparat czynników Nod, molibden oraz roztwór LCOs+Mo mogą ograniczać negatywne skutki niedoboru wody w glebie.

## 6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Przedsięwzięcie zaprawianie nasion grochu preparatem Nod oraz LCOs+Mo korzystnie wpłynęło na wschody roślin oraz ich dynamikę szczególnie pomiędzy 5 a 7 dniem od siewu.
2. Zastosowanie preparatu czynników Nod oraz molibdenu istotnie różnicowało wysokość roślin rosnących zarówno w warunkach stresu suszy jak i w warunkach optymalnych, z czego najlepsze efekty uzyskano stosując obydwa preparaty łącznie.
3. Zaprawianie nasion uwzględnionymi w badaniach preparatami korzystnie wpłynęło na wskaźnik bezwzględnej szybkości wzrostu roślin (GR), szczególnie do fazy pełni kwitnienia grochu. Stres suszy spowodował zwiększenie dynamiki przyrostu masy korzeniowej roślin, przy czym efekty te były większe dla obiektu kontrolnego niż pozostałych obiektów.
4. Zastosowanie ww. preparatów zwiększyło liczbę oraz masę brodawek korzeniowych grochu rosnącego zarówno w warunkach stresu suszy jak i optymalnych warunkach wilgotności gleby. Istotnie większą liczbę brodawek uzyskano w warunkach optymalnych. Największą masę pojedynczej brodawki odnotowano u roślin z obiektu kontrolnego. Najlepszy efekt brodawkowania uzyskano stosując zaprawę nasienną w postaci preparatu LCOs+Mo.
5. Zarówno w optymalnych warunkach wilgotności gleby jak w i warunkach stresu suszy preparat czynników Nod, molibden oraz LCOs+Mo korzystnie wpływały na wskaźniki morfologiczne i fizjologiczne grochu, z czego najlepsze efekty uzyskano stosując łącznie preparat LCOs i molibden.
6. Stres suszy spowodował spadek wartości wskaźników fizjologicznych roślin grochu, jednak wartości te były istotnie wyższe u roślin wyrosłych z nasion zaprawianych preparatem LCOs, Mo oraz LCOs+Mo. Niższe wartości parametrów wymiany gazowej oraz fluorescencji chlorofilu były wynikiem wartości indeksu SPAD liści spowodowanego czynnikiem stresowym. Istotnie niższe wartości wskaźników fizjologicznych uzyskano w warunkach stresu suszy.
7. Niezależnie od poziomu wilgotności gleby najwyższy plon nasion otrzymano w obiekcie z roślinami wyrosłymi z nasion zaprawianych przed siewem preparatem LCOs+Mo. Na wielkość plonu nasion grochu wpłynęła zwiększona obsada strąków na roślinie oraz większa liczba nasion z rośliny.

8. Preparat czynników Nod (LCOs) oraz LCOs+Mo wykazują korzystne działanie na metabolizm, skład chemiczny oraz wzrost, rozwój i plonowanie grochu. Wymienione preparaty mogą także ograniczać negatywny wpływ stresu suszy występujący w okresie wegetacji roślin grochu.
9. Uzyskane wyniki są przesłanką do kontynuacji badań uwzględniających stosowanie czynników Nod łącznie z innymi preparatami (nawozami mikroelementowymi, szczepionkami bakteryjnymi) w celu polepszenia plonowania grochu siewnego.

## LITERATURA

1. Adamczyk B., Godlewski M. 2010. Różnorodność strategii pozyskiwania azotu przez rośliny. Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych, 59(1-2), 211-222.
2. Almaraz J.J., Mabood F., Zhou X., Souleimanov A., Smith D.L. 2011. Effect of Nod factor sprays on soybean growth and productivity under field conditions. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil & Plant Science, 61(3), 228–234.
3. Andrews M., Lea P.J. 2013. Our nitrogen „footprint”: the need for increased crop nitrogen use efficiency. Annals of Applied Biology, 163(2), 165-169.
4. Atti S., Bonnell R., Prasher S., Smith D.L. 2005. Response of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under chronic water deficit to LCO application during flowering and pod filling. Irrigation and Drainage, 54(1), 15-30.
5. Barnett M.J., Fisher R.F. 2006. Global gene expression in the rhizobial-legume symbiosis. Symbiosis, 42, 1-24.
6. Bashan Y., de-Bashan L.E., Prabhu S.R., Hernandez J.P. 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). Plant and Soil, 378, 1-33.
7. Begum A.A., Leibovitch S., Migner P., Zhang F. 2001. Inoculation of pea (*Pisum sativum* L.) by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* preincubated with naringenin and hesperetin or application of naringenin and hesperetin directly into soil increased pea nodulation under short season conditions. Plant, Soil and Environment, 237, 71-80.
8. Bergmann W. 1997. Atlas objawów niedoboru lub nadmiaru składników pokarmowych u roślin uprawnych. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 183-212.
9. Błaszczak M.K. 2010. Mikrobiologia środowisk. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, s. 219-239.
10. Bochniarz J., Bochniarz M., Lenartowicz W. 1987. Wpływ zaprawiania nasion nitraginą i molibdenem oraz nawożenia azotem na plonowanie bobiku (*Vicia faba minor*). Pamiętnik Puławski, 89, 29-40.
11. Bodah E.T., Braunwart K., Bodah B.W., Alcindo Neckel A. 2015. A rapid morphological screening procedure for pea (*Pisum sativum* L.) under drought stress in greenhouse settings. American Journal of Experimental Agriculture, 8(1), 68-74.
12. Boguszewski W., Kac Kacas M. 1966. Wapnowanie gleb. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, s. 119-125.

13. Borowiecki J. 2004. Nowe aspekty symbiotycznego wiązania azotu. *Postępy Nauk Rolniczych*, 2, 9-18.
14. Borucki W. 1998. Struktura i funkcjonowanie brodawek korzeniowych roślin motylkowatych. *Wiadomości Botaniczne*, 42(1), 41-61.
15. Bothe H., Schmitz O., Yates M.G., Newton W.E. 2010. Nitrogen Fixation and Hydrogen Metabolism in Cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(4), 529-551.
16. Brestic M., Zivcak M. 2013. PSII Fluorescence Techniques for measurement of Drought and High Temperature Stress Signal in Crop Plants: Protocols and Applications. *Molecular Stress Physiology of Plants*, 87-131.
17. Bucher M. 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist*, 173(1), 11-26.
18. Carranca C., Varennes A., Rolston D. 1999. Biological nitrogen fixation by fababeans, pea and chickpea, under field conditions, estimated by the <sup>15</sup>N isotope dilution technique. *European Journal of Agronomy*, 10, 49-56.
19. Catroux G., Hartmann A., Revellin C. 2001. Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant and Soil*, 230, 21-30.
20. Cheng Q. 2008. Perspectives in biological nitrogen fixation research. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(7), 784-796.
21. Cooper J.E. 2007. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal Applied Microbiology*, 103(5), 1355-1365.
22. Czarnowska K. 1978. Zinc, manganese, copper and molybdenum in alluvial soils. *Polish Ecological Studies*, 4(1), 21-25.
23. Czerwińska-Kayzer D. 2015. Wpływ dopłat na dochodowość uprawy roślin strączkowych. *Roczniki Naukowe SERiA XVII* (3), 72-78.
24. Czuba R. 2000. Mikroelementy we współczesnych systemach nawożenia. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 471(2), 161-169.
25. D'Haese W., Holsters M. 2002. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*, 12, 79-105.
26. Deakin W.J., Broughton W.J. 2009. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion system. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 312-320.
27. Dechorgnat J., Nguyen C.T., Armengaud P., Jossier M., Diatloff E., Filleur S., Daniel-Vedele F. 2011. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62, 1349-1359.

28. Denison R.F., Kiers E.T. 2011. Life histories of symbiotic rhizobia and mycorrhizal fungi. *Current Biology*, 21, 775-785.
29. Downie J.A. 1998. Functions of rhizobial nodulation genes. In: *The Rhizobiaceae*. Spaink H.P., Kondorosi A., Hooykaas P.J.J. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 387-402.
30. Dragańska E., Szwejkowski Z., Banaszkiwicz B. 2005. Niedobory i nadmiary opadów w okresie wegetacji grochu siewnego i bobiku w Polsce północno-wschodniej, w wieloletnim 1971-2000. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie*, 5(14), 119-128.
31. Duysens L.N.M., Ames J., Kamp B.M. 1961. Two photochemical systems in photosynthesis. *Nature*, 190, 510-511.
32. Ellser J.J., Backen M.E.S., Cleland E.E., Gruner D.S., Harpole W.S., Hillebrand H., Ngai J.T., Seabloom E.W., Shurin J.B., Smith J.E. 2007. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 10, 1135-1142.
33. El-Hersch M.S., Abd El-Hai K.M., Ghanem K.M. 2011. Efficiency of Molybdenum and Cobalt Elements on the Lentil Pathogens and Nitrogen Fixation. *Asian Journal of Plant Pathology*, 5(3), 102-114. DOI: 10.3923/ajppaj.2011.102.114.
34. European Soy Monitor. Insights on the European uptake of responsible and deforestation-free soy in 2019.  
<https://www.idhsustainabletrade.com/uploaded/2021/06/2019-IDH-European-Soy-Monitor-report.pdf> [data dostępu: 10.08.2023r.].
35. Evans G.C. 1972. *The quantitative analysis of plant growth*. Studies in ecology. University of California Press, Berkeley, Los Angeles.
36. Faber A. 1992. Bezpośrednie i następcze działanie nawożenia borem, miedzią, molibdenem i cynkiem w zmianowaniu czteropolowym. *IUNG Puławy*, H(2), 1-81.
37. Finn G.A., Brun W.A. 1982. Effect of atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment in growth, nonstructural carbohydrate content, and root nodule activity in soybean. *Plant Physiology*, 69, 327-331.
38. Flexas J., Medrano, H. 2002. Drought-Inhibition of Photosynthesis in C<sub>3</sub> Plants: Stomatal and Non-Stomatal Limitations Revisited. *Roczniki Botaniki*, 89, 183-189.
39. Forouzesh E., Goel A., Mackenzie S.A., Turner J.A. 2013. In vivo extraction of Arabidopsis cell turgor pressure using nanoindentation in conjunction with finite element modeling. *The Plant Journal*, 73, 509-520.



40. Fotyma E., Wilkos G., Pietruch C. 1998. Test glebowy azotu mineralnego. Możliwość praktycznego wykorzystania. Materiały Szkoleniowe. IUNG-PIB Puławy, 69, 1-48.
41. Fowler D., Coyle M., Skiba U., Sutton M.A., Cape J.N., Reis S., Sheppard L.J., Jenkins A., Bruna Grizzetti B., Galloway J.N., Witousek P., Leach A., Bouwman A.F., Butterbach-Bahl K., Dentener F., Stevenson D., Amann M., Voss M. 2013. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society. B: Biological Sciences*, 368(1621), 20130164.
42. Gage D.J. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing Rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 280-300.
43. Gembarzewski H., Stanisławska E. 1987. Potrzeba nawożenia molibdenem i miedzią w Polsce na podstawie badań gospodarstw kontrolowanych IUNG. *Roczniki Gleboznawcze*, 38(2), 161-174.
44. Golińska B., Mądrzak C.J. 1999. Współzawodnictwo pomiędzy szczepami bakterii brodawkujących rośliny motylkowate. *Biotechnologia*, 3(46), 106-124.
45. Gorlach E. 1963. Zawartość molibdenu w niektórych glebach Polski Południowej. *Roczniki Gleboznawcze*, 13, 213-225.
46. Gorlach E. 1967. Molibden w glebach i jego przyswajalność dla roślin. *Acta Agraria et Silvestria. Series Agraria*, 7(1), 79-149.
47. Gorlach E., Mazur T. 2001. *Chemia Rolna*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, s. 347.
48. Good A. 2018. Toward nitrogen-fixing plants. A concerted research effort could yield engineered plants that can directly fix nitrogen. *Science*, 359, 869-870.
49. Grabowska K., Banaszekiewicz B. 2009. Wpływ temperatury powietrza i opadów atmosferycznych na plonowanie grochu siewnego w środkowej Polsce. *Acta Agrophysica*, 13(1), 113-120.
50. Graham P.H. 1992. Stress tolerance in Rhizobium and Bradyrhizobium, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 38, 475-484.
51. Graham P.H., Vance C.P. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131, 872-877.
52. Greenwood DJ. 1982. Nitrogen supply and crop yield: the global scene. *Plant and Soil*, 67, 9-45.

53. Guan X.K., Song L., Wang T.C., Turner N.C., Li F.M. 2015. Effect of drought on the gas exchange, chlorophyll fluorescence and yield of six different-era spring wheat cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 201, 253-266.
54. Gujjaiiah S., Kumari Ch. 2013. Evaluation of changes in  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase and protease during germination of cereals. *International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR)*, 3(3), 55-62.
55. Hadri A-E., Spaink H.P., Bisseling T., Brewin N.J. 1998. Diversity of root nodulation and egizobial infection processes. In: *The Rhizobiaceae*; eds: H.P. Spaink, A. Kondorosi P.J.J., Hooykaas, Kluwer Academic Publishers, 347-360.
56. Halbleib C.M., Ludden P.W. 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1081-1084.
57. Harris J.M., Wais R., Long S.R. 2003. *Rhizobium*-induced calcium spiking in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(4), 335-341.
58. He J., Chee C.W., Goh C.J. 1996. Photoinhibition of *Heliconia* under natural tropical conditions: the importance of leaf orientation for light interception and leaf temperature. *Plant, Cell & Environment*, 19, 1238-1248.
59. Herridge D.F., Peoples M.B., Boddey R.M. 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, 311(1-2), 1-18.
60. Hirsch A.M. 1992. Development biology of legume nodulation. *New Phytologist*, 122, 211-237.
61. Howieson J.G., Robson A.D., Ewing M.A. 1993. External phosphate and calcium confrontations, and pH, but not the products of rhizobial nodulation. Genes, affect the attachment of *Rhizobium meliloti* to roots of annual medics. *Soil Biology and Biochemistry*, 25(5), 567-573.
62. Ishizuka J. 1992. Trends in biological nitrogen fixation research and application. *Plant and Soil*, 141(1-2), 197-209.
63. Jadczyzyn T. 2000. Podstawy naukowe doradztwa nawozowego. *Nawozy i Nawożenie*, 4(5), 185-205.
64. Jadczyzyn T., Kowalczyk J., Lipiński W. 2008. Zalecenia nawozowe dla roślin uprawy polowej i trwałych użytków zielonych. *Materiały szkoleniowe, IUNG Puławy*, 95, 1-24.
65. Jadczyzyn T., Ochal P. 2013. Zakwaszenie gleb i potrzeby wapnowania. W: *Problemy gospodarski nawozowej w Polsce. Studia i Raporty IUNG-PIB*, 34(8), 9-18.

66. Jasińska Z., Malarz W. 1983. Wpływ nawożenia fosforowo-potasowego i zagęszczenia roślin na rozwój i plonowanie łubinu białego i bobiku. Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu, 125-134.
67. Jensen E.S., Peoples M.B., Boddey R.M., Gresshoff P.M., Hauggaard-Nielsen H., Alves B.J.R., Morrison M.J. 2012. Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. *Agronomy for Sustainable Development*, 32, 329-364.
68. Jones K.M., Kobayashi H., Davies B.W., Taga M.E., Walker G.C. 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 619-633.
69. Kabata-Pendias A. 1996. Biogeochemia miedzi i molibdenu. Zeszyty Naukowe. Polska Akademia Nauk. Komitet Naukowy przy Prezydium PAN. Człowiek i Środowisko, 14,11-19.
70. Kabata-Pendias A., Mukherjee A.B. 2007. Trace elements from soil to human. Springer, Verlag, Berlin, 57-65.
71. Kabata-Pendias A., Pendias H. 1999. Biogeochemia pierwiastków śladowych. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, s. 398.
72. Kacperska A. 1998. Reakcje roślin na czynniki stresowe. Podstawy fizjologii roślin, PWN, Warszawa.
73. Kalaji M.H., Łoboda T. 2010. Fluorescencja chlorofilu w badaniach stanu fizjologicznego roślin. Wydawnictwo SGGW, Warszawa, s. 9-63.
74. Kapusta F. 2012. Rośliny strączkowe źródłem białka dla ludzi i zwierząt. *Nauki Inżynierskie i Technologie*, 1(4), 16-32.
75. Kasper S., Christoffersen B., Soti O., Racelis A. 2019. Abiotic and biotic limitations to nodulation by leguminous cover crops in South Texas. *Agriculture*, 9(10), 209. DOI:10.3390/agriculture9100209.
76. Katyál J.C., Randhawa N.S. 1983. Micronutrients. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 7, 69-76.
77. Kennedy I.R., Tchan Y.T. 1992. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: recent advances. *Plant and Soil*, 141(1-2), 93-118.
78. Kidaj D., Wielbo J., Skorupska A. 2012. Nod factors stimulate seed germination and promote growth and nodulation of pea and vetch under cooperative conditions. *Microbiological Research*, 167(3), 144-150.

79. Klama J. 2004. Współżycie endofitów bakteryjnych z roślinami. *Acta Scientiarum Polonorum Agricultura*, 3(1), 19-28.
80. Kocoń A. 1999. Wskaźniki symbiotycznego wiązania N<sub>2</sub> w zależności od zróżnicowanego żywienia bobiku azotem. *Fragmenta Agronomica*, 2(16), 50-61.
81. Kocoń A. 2007. Potrzeby pokarmowe roślin, niedobory składników i metody oceny stanu odżywienia roślin. W: *Integrowana produkcja roślinna. Zagadnienia wybrane. Praca zbiorowa pod redakcją J. Podleśnego*, Puławy, 181-186.
82. Kocoń A. 2010. Perspektywy stosowania mikroelementów w uprawach rolniczych. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 25, 43-51.
83. Kocoń A. 2013. Potrzeby nawożenia mikroelementami. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 34(8), 133-144.
84. Kocoń A. 2014a. Nawożenie roślin strączkowych. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 37(11), 127-137.
85. Kocoń A. 2014b. Potrzeby pokarmowe roślin. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 37(11), 19-31.
86. Kocoń A., Podleśna A. 2004. Wstępna ocena efektywności fotosyntetycznej wybranych odmian pszenicy ozimej w warunkach stresu wodnego. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 496, 259-266.
87. Koljonen T. (eds.) 1992. *The Geochemical Atlas of Finland, Part. 2: Till*. Espoo: Geological Survey of Finland, s. 218.
88. Kollist H., Zandalinas S. I., Sengupta S., Nuhkat M., Kangasjärvi J., Mittler R. 2019. Rapid responses to abiotic stress: priming the landscape for the signal transduction network. *Trends in Plant Science*, 24, 25-37.
89. Korol W., Rubaj J., Bielecka G. 2013. Zawartość selenu, kobaltu i molibdenu w krajowych mieszankach paszowych. *Roczniki Naukowe Zootechniki*, 40(1), 55-64.
90. Korsak-Adamowicz M., Dopka D., Płotczyk B. 2012. Prowadzenie gospodarstw rolnych w różnych systemach a wpływ na środowisko przyrodnicze. *Fragmenta Agronomica*, 29(2), 77-86.
91. Kotecki A. 1990. Wpływ dolistnego nawożenia molibdenem na plonowanie odmian grochu. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu, Rolnictwo LII*, 121-132.
92. Kotecki A., Kozak M. 2020. Część VIII. Rośliny bobowate grubonasienne (strączkowe). W: *Uprawa roślin. Tom III*, Pod redakcją Andrzeja Koteckiego, 95-121.

93. Kotlarz A., Sujak A., Strobel W. 2011. Chemical composition and nutritive value of protein of the pea seeds: effect of harvesting year and variety. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 75(1), 57-69.
94. Kraiser T., Gras D.E., Gutierrez A.G., Gonzalez B., Gutierrez R.A. 2011. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62, 1455-1466.
95. Kretowicz W. 1977. Przemiany azotu w roślinach. Powszechne Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa.
96. Kruczyńska H. 1985. Zapotrzebowanie zwierząt na mikroelementy. *Prace Komisji Naukowej PTG*, 93, 37-42.
97. Krug E.C., Winstanley D. 2002. The need for comprehensive and consistent treatment of the nitrogen cycle in nitrogen cycling mass balance studies: I. Terrestrial nitrogen cycle. *Science of the Total Environment*, 293, 1-29.
98. Król M.J. 2006. *Azospirillum* – asocjacyjne bakterie wiążące azot. Monografie i Rozprawy Naukowe, IUNG-PIB, Puławy, 15(45-74).
99. Król M.J., Zielewicz-Dudkowska J. 2005. Genetyczne aspekty wiązania N<sub>2</sub> bakterii z rodzaju *Azospirillum*. *Postępy Mikrobiologii*, 44(1), 47-56.
100. Kucharzewski A., Dębowski M. 2000. Odczyn i zawartość mikroelementów w glebach Polski. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 471, 627-635.
101. Kudak C. 1994. Reakcja grochu (*Pisum sativum* L.) na siarczan miedziowy w zależności od dawki. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu. Rolnictwo*, 62, 25-31.
102. Kulig B., Kołodziej J., Oleksy A., Kołodziejczyk M., Sajdak A. 2021. Influence of the weather conditions on faba bean yielding. *Ecological Chemistry and Engineering A*, 18(8), 1071-1077.
103. Kulig B., Ziółek W. 1997. Reakcja zrozcowanych morfologicznie odmian bobiku na nawożenie azotem i nawozami mikroelementowymi. *Acta Agraria et Silvestria. Series Agraria*, 35, 51-61.
104. Kunhikrishnan A., Thangarajan R., Bolan N.S., Xu Y., Mandal S., Gleeson D.B., Seshadri B., Zaman M., Barton L., Tang C., Luo J., Dalal R., Ding W., Kirkham M.B., Naidu R. 2016. Chapter One – Functional Relationships of Soil Acidification, Liming, and Greenhouse Gas Flux. *Advances in Agronomy*, 139, 1-71.
105. Lamaoui M., Jemo M., Datla R., Bekkaoui F. 2018. Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. *Frontiers in Chemistry*, 6(26), 1-14.
106. Leibovitch S., Migner P., Zhang F., Smith D.L. 2001. Evaluation of the effect of SoyaSignal technology on soybean yield (*Glycine max.* (L.) Merr.) under field

- conditions over 6 years in eastern Canada and the northern United States. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 187, 281-292.
107. Lesk C., Rowhani P., Ramankutty N. 2016. Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature*, 529, 84-87.
108. Libbenga K.R., Harkes P.A.A. 1973. Initial proliferation of cortical cells in the formation of root nodules in *Pisum sativum* L. *Planta*, 114, 17-28.
109. Lipiński W. 2013. Zasobność gleb Polski w mikroelementy. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 34(8), 121-131.
110. Lista Opisowa Odmian Roślin Rolniczych COBORU 2016-2023.
111. Long S.R. 2001. Genes and signals in the *Rizobium*-legume symbiosis. *Plant Physiology*, 125, 69-72.
112. Łyszcz M., Gałązka A. 2016. Proces biologicznego wiązania azotu atmosferycznego. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 49(3), 59-70.
113. Machul M., Jadczyzyn T. 2005. Przydatność wskaźnika względnej zawartości chlorofilu do oceny stanu odżywienia kukurydzy azotem. *Pamiętnik Puławski*, 140, 173- 185.
114. Mancinelli R.L. 1996. The nature of nitrogen: an overview. *Life Support & Biosphere Science*, 3(1-2), 17-24.
115. Maj D., Wielbo J., Marek-Kozaczuk M., Skorupska A. 2010. Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiological Research*, 165, 50-60.
116. Maksimow A. 1949. Mikroelementy i mikronawozy. Państwowy Instytut Wydawnictw Rolniczych, s. 220-2338.
117. Martignago D., Rico-Medina A., Blasco-Escaméz D., Fontanet-Manzaneque J. B., Caño-Delgado A. I. 2020. Drought resistance by engineering plant tissue-specific responses. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1676.
118. Martinez-Espinosa R.M., Cole J.A., Richardson D.J., Wartmough N.J. 2011. Enzymology and ecology of the nitrogen cycle. *Biochemical Society Transactions*, 39, 175-178.
119. Martyniuk S. 2006. Znaczenie procesu biologicznego wiązania azotu atmosferycznego w rolnictwie ekologicznym. *International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology*, 53(4), 9-14.

120. Martyniuk S. 2008. Znaczenie procesu biologicznego wiązania azotu atmosferycznego w rolnictwie ekologicznym. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 53(4), 9-14.
121. Martyniuk S. 2010. Production of microbial preparations symbiotic bacteria of legumes as an example. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 55(3), 20-23.
122. Martyniuk S. 2012. Naukowe i praktyczne aspekty symbiozy roślin strączkowych z bakteriami brodawkowymi. *Polish Journal of Agronomy*, 9, 17-22.
123. Martyniuk S. 2019. Biologiczne wiązanie N<sub>2</sub>, bakterie symbiotyczne roślin bobowatych w glebach Polskich i oszacowywanie ich liczebności. *Polish Journal of Agronomy*, 38, 52-65.
124. Martyniuk S., Woźniakowska A., Martyniuk M. 1999. Interakcje pomiędzy zaprawami chemicznymi i szczepionką Rhizobium na nasionach grochu. *Postępy Ochrony Roślin*, 39(1), 120-125.
125. Martyniuk S., Oroń J., Martyniuk M. 2005. Diversity and numbers of root-nodule bacteria (rhizobia) in Polish soils. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 74(1), 83-86. DOI: 10.5586/asbp.2005.012.
126. Martyniuk S., Oroń J., Martyniuk M., Woźniakowska A. 2002. Effects of interactions between chemical seed dressings and Bradyrhizobium Japonicum on soybean seeds. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 48(4), 305-310.
127. Matyka S., Burczyńska-Niedziałek A., Korol W. 1985. Skład chemiczny nasion krajowych odmian roślin strączkowych grubonasiennych. *Biuletyn Informacji Przemysłu Paszowego*, 1, 3-10.
128. Matysiak K., Adamczewski K. 2009. Regulatory wzrostu i rozwoju roślin – kierunki badań w Polsce i na świecie. *Progress in Plant Protection*, 49(4), 1810-1816.
129. Mazur T., Mazur Z. 2004. Pobranie przez plon roślin i zawartość w glebach miedzi, manganu i cynku w zależności od systemu nawożenia. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 502(1), 229-234.
130. Mazurczyk W., Grzeškiewicz H. 2001. Wpływ nawożenia potasem na dystrybucję w roślinach ziemniaka suchej masy potasu i magnezu oraz stan odżywienia tym składnikiem. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 480, 475-487.
131. Mądrzak C.J. 1995. Molekularne mechanizmy symbiozy Rhizobiaceae z roślinami motylkowatymi. *Rozprawa habilitacyjna*, Wydawnictwo Akademia Rolnicza w Poznaniu, s.232.

132. McAllister C.H., Beatty P.H., Good A.G. 2012. Engineering nitrogen use efficient crop plants: the current status. *Plant Biotechnology Journal*, 10, 1011-1025.
133. Mengel K. 1994. Symbiotic dinitrogen fixation – its dependence on plant nutrition and its ecophysiological impact. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 157, 233-241.
134. Mergaert P., van Montagu M., Holsters M. 1997. Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Molecular Microbiology*, 25(5), 811-817.
135. Miransari M., Smith D. 2009. Rhizobial lipo-chitoooligosaccharides and gibberellins enhance barley (*Hordeum vulgare* L.) seed germination. *Biotechnology*, 8(2), 270-275.
136. Monahan-Giovanelli H., Pinedo C.A., Gage D.J. 2006. Architecture of infection thread networks in developing root nodules induced by the symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti* on *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 140(2), 661-670.
137. Mrówczyński M., Wachowiak H., Seta G. 2000. Łączenie zabiegów ochrony rzepaku z dolistnym dokarmianiem roślin. W: Zbilansowane nawożenie rzepaku. Aktualne problemy. AR Poznań, 121-128.
138. Mutch L.A., Young J.P.W. 2004. Diversity and specificity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* on wild and cultivated legumes. *Molecular Ecology*, 13, 2435-2444.
139. Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G., Renella G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 53, 655-670.
140. Nopora A., Kacprzak M., Nowak K., Grobelak A. 2015. Wpływ bakterii endofitycznych na promowanie wzrostu roślin w warunkach stresowych. *Postępy Biochemii*, 61(4), 398-402.
141. Newcomb W., Sippell D., Peterson R.L. 1979. The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. *Canadian Journal of Botany*, 57, 2603-2616.
142. Nogalska A. 2013. Changes in the soil nitrogen content caused by direct and residual effect of meat and bone meal. *Journal of Elementology*, 18(4), 659-671.
143. Novák K., Chowanec P., Škredleta V., Kropáčová M., Lisá L., Němcová M. 2002. Effect of exogenous flavonoids on nodulation of pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of Experimental Botany*, 53, 1735-1745.
144. Ochal P., Jadczyż T., Jurga B., Kopiński J., Matyka M., Madej A., Rutkowska A., Smreczak B., Łysiak M. 2017. Środowiskowe aspekty zakwaszenia gleb w Polsce. IUNG-PIB Puławy, s.44.



145. Oldroyd G.E., Dixon R. 2014. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 19-24.
146. Oldroyd G.E., Downie J.A. 2004. Calcium, kinase and nodulation signalling in legumes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 566-576.
147. Oldroyd G.E., Murray J.D., Poole P.S., Downie J.A. 2011. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45, 119-144.
148. Oleńska E. 2015. Asocjacja symbiotyczna roślin bobowatych z ryzobiami. W: *Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu. Funkcjonowanie roślin i grzybów. Środowisko-Eksperyment-Edukacja*. A. Bajguz, I. Ciereszko (red.), Polskie Towarzystwo Botaniczne, 187-200.
149. Olszewska M., Grzegorzczak S., Olszewski J., Bałuch-Małecka A. 2010. Porównanie reakcji wybranych gatunków traw na stres wodny. *Łąkarstwo w Polsce*, 13, 127-136.
150. Olszewski J., Pszczółkowska A., Kulik T., Fordoński G., Płodzień K., Okorski A., Wasilewska J. 2007. Effect of water deficit on gas exchange parameters, productivity and grain health of winter wheat cultivars. *Acta Scientiarum Polonorum, Agricultura* 6(4), 33-42.
151. Osman H.S. 2015. Enhancing antioxidant-yield relationship of pea plant under drought at different growth stages by exogenously applied glycine betaine and proline. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 389-402.
152. Ovtsyna A.O., Schultze M., Tikhonovicgh I.A., Spaink H.P., Kondorosi E., Kondorosi A., Staehelin C. 2000. Nod factors of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and their fucosylated derivatives stimulate a Nod factor cleaving activity in pea roots and are hydrolyzed in vitro by plant chitinases at different rates. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13, 799-807.
153. Pan J., Lin S., Woodbury N.W. 2012. Bacteriochlorophyll excited-state quenching pathways in bacterial reaction centers with the primary donor oxidized. *The Journal of Physical Chemistry B* 116(6), 2014-2022.
154. Pejwe J.W. 1968. *Biochemia i agrochemia mikroelementów*. Zeszyty Naukowe Wyższej Szkoły Rolniczej w Krakowie, nr 44, Sesja Naukowa 1964, s. 103-115.
155. Peoples M.B., Brockwell J., Herridge D.F., Rochester I.J., Alves B.J.R., Urquiaga S., Boddey R.M., Dakora F.D., Bhattarai S., Maskey S.L., Sampet C., Rerkasem B., Khan D.F., Hauggaard-Nielsen H., Jensen E.S. 2009. The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis*, 48, 1-17.

156. Perret X., Staehelin C., Spaink H.P. 2000. Molecular basis of symbiotic Promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 180-201.
157. Philips D.A. 1980. Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Annual Review of Plant Physiology*, 31, 29-49.
158. Piaseczna A. 2012. Molibden i cyna w glebach Polski. *Biuletyn Państwowego Instytutu Geologicznego*, 450, 75-82.
159. Podleśna A. 2018. Proces wiązania N<sub>2</sub> przez rośliny bobowate jako źródło azotu dla roślin uprawnych. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 56(10), 71-85.
160. Podleśna A., Cacak-Pietrzak G. 2006. Kształtowanie plonu oraz paramentów przemiałowych i wypiekowych pszenicy jarej poprzez nawożenia azotem i siarką. *Pamiętnik Puławski*, 142, 381-382.
161. Podleśny J. 2007. Znaczenie roślin strączkowych w integrowanej produkcji roślinnej. W: *Integrowana produkcja roślinna Zagadnienia wybrane. Praca zbiorowa pod redakcją J. Podleśnego*, Puławy, 15-160.
162. Podleśny J. 2008. Wpływ stresu suszy na plon nasion i białka bobiku. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 524, 213-220.
163. Podleśny J., Bieniaszewski T. 2012. Ocena plonowania grochu siewnego (*Pisum sativum* L.) w różnych rejonach Polski. *Fragmenta Agronomica*, 29(4), 125-135.
164. Podleśny J., Podleśna A. 2010. The estimation of water demands of determinate and traditional cultivars of faba bean (*Vicia faba* L.) *Polish Journal of Agronomy*, 2, 44-49.
165. Podleśny J., Podleśna A. 2011. Effect of rainfall amount and distribution on growth, development and yields of determinate and indeterminate cultivars of blue lupin. *Polish Journal of Agronomy*, 4, 16-22.
166. Podleśny J., Podleśna A. 2012. Ocena porażenia roślin grochu siewnego przez grzyby i organizmy grzybopodobne w różnych rejonach Polski. *Postępy w Ochronie Roślin*, 52(3), 663-670.
167. Podleśny J., Podleśna A. 2014. Główne problemy związane z technologią produkcji nasion roślin strączkowych. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 41(15), 9-20.
168. Podleśny J., Wielbo J., Podleśna A., Kidaj D. 2013a. Przydatność stosowania preparatu czynników Nod (LCOs) do przedsiewnego zaprawiania nasion grochu siewnego (*Pisum sativum* L.). *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 58(4), 124-129.

169. Podleśny J., Wielbo J., Podleśna A., Kidaj D. 2013b. The pleiotropic effects of extract containing rhizobial Nod factors on pea growth and yield. *Central European Journal of Biology*, 9(4), 396-409.
170. Podleśny J., Wielbo J., Podleśna A., Kidaj D. 2014. The responses of two pea genotypes to Nod factors (LCOs) treatment. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 12(2), 554-558.
171. Podleśny J., Wielbo J., Podleśna A., Perzyński A. 2017. Ocena wpływu molibdenu i lipochitooligosacharydów na plonowanie grochu siewnego. *Przemysł Chemiczny*, 98(8), 1805-1808. DOI: 10.15199/62.2017.8.42.
172. Powierzchnie upraw w gminach. <https://rejestrupraw.arimr.gov.pl> [data dostępu: 10.08.2023r.].
173. Prithiviraj B., Zhou X., Souleimanov A., Khan W.M., Smith D.L. 2003. A host-specific bacteria to plant signal molecule (nod factor) enhances germination and early growth of diverse crop plants. *Planta*, 216, 437-445.
174. Produkcja upraw rolnych i ogrodnich. GUS Warszawa, lata 2014-2019.
175. Prusiński J., Kotecki A. 2006. Współczesne problemy produkcji roślin motylkowatych. *Fragmenta Agronomica*, 23(3), 94-126.
176. Puczel J., Borusiewicz A. 2014. Plonowanie pięciu odmian grochu pastewnego na glebach słabych w roku 2013. *Zeszyty Naukowe Wyższej Szkoły Agrobiznesu w Łomży*, 54, 80-92.
177. Pudełko K., Narożna D., Króliczak J., Kidaj D., Wielbo J., Skorupska A., Mądrzak C. 2017. Czynniki Nod jako potencjalne stymulatory procesu brodawkowania łubinu. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu*, 626, 115-132.
178. Pytlarz-Kozicka M. 2010. Wpływ ochrony roślin i szczepienia nitraginą na zdrowotność i plonowanie dwóch odmian łubinu żółtego. *Progress in Plant Protection*, 50(1), 47-51.
179. Reiter K., Schmidtke K., Rauber R. 2002. The influence of long-term tillage systems on symbiotic N<sub>2</sub> fixation of pea (*Pisum sativum* L.) and red clover (*Trifolium pratense* L.). *Plant Soil*, 238, 41-55.
180. Reynolds-Henne C.R., Langenegger A., Mani J., Schenk N., Zumsteg A., Feller U. 2010. Interactions between temperature, drought and stomatal opening in legumes. *Environmental and Experimental Botany*, 68(1), 37-43.
181. Rogers C., Oldroyd G.E. 2014. Synthetic biology approaches to engineering the nitrogen symbiosis in cereals. *Journal of Experimental Botany*, 65(8), 1939-1946.

182. Rubio L.M., Ludden P.W. 2008. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annual Reviews of Microbiology*, 62(1), 93-111.
183. Rumaszk-Rudnicka E. 2010. Wpływ nawadniania i nawożenia azotem na asymilację i transpirację życicy westerwoldzkiej. *Acta Agrophysica*, 15(2), 395-408.
184. Sadowski M.J., Graham P.H., 1998. Soil biology of the Rhizobiaceae. In: *The Rhizobiaceae*. Spaink H.P., Kondorosi A., Hooykaas P.J.J. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, s. 155-172.
185. Sallam A., Alqudah A. M., Dawood M. F., Baenziger P. S., Börner A. 2019. Drought stress tolerance in wheat and barley: advances in physiology, breeding and genetics research. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3137.
186. Samborski S., Rozbicki J. 2002. Przegląd badań nad wykorzystaniem chlorofilometru SPAD 502 do oceny stanu odżywienia roślin azotem. *Nawozy i Nawożenie – Fertilizers and Fertilization* 2(11), 123-136.
187. Samoraj M., Tuhy Ł., Rój E., Chojnacka K. 2014. Ocena właściwości nawozowych nowych biokomponentów z mikroelementami w warunkach *in vivo*. *Przemysł Chemiczny*, 93(8), 1432-1436.
188. Sawicka A. 1997. Czynniki ograniczające wiązanie azotu atmosferycznego u roślin motylkowatych i traw. *Biuletyn Oceny Odmian*, 29, 53-58.
189. Sayed O.H. 2003. Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *Photosynthetica*, 41(3), 321-330.
190. Sebito M., Mayer B., Nicolardot B., Pinay G., Mariotti A. 2013. Long-term fate of nitrate fertilizer in agricultural soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 18185-18189.
191. Seefeldt L.C., Brain M., Hoffman B.M., Dean D.R. 2009. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 701-722.
192. Seliga H. 1996. Zawartość i rozmieszczenie miedzi oraz molibdenu w łubinem żółtym w warunkach niedoboru miedzi. *Zeszyty Naukowe. Polska Akademia Nauk. Komitet Naukowy przy Prezydium PAN Człowiek i Środowisko*, 14, 148-152.
193. Siczek A., Lipiec J., Wielbo J., Kidaj D., Szarlip P. 2014. Symbiotic Activity of Pea (*Pisum sativum*) after application of Nod Factors under field conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 7344-7351.
194. Sikder S., Qiao Y., Baodi D., Shi C., Liu M. 2016. Effect of water stress on leaf level gas exchange capacity and water-use efficiency of wheat cultivars. *Indian Journal of Plant Physiology*, 21(3), 300-305.

195. Skorupska A., Wielbo J., Kidaj D., Marek-Kozaczuk M. 2010. Enhancing Rhizobium-legume symbiosis using signaling factors. In: *Microbes for Legume Improvement*, M.S. Khan, J. Musarrat, A., Zaidi (eds.), Springer-Verlag, Vienna, s. 27-54.
196. Smil V. 2011. Nitrogen cycle and world food production. *World Agriculture*, 2, 9-1.
197. Smreczak B., Ochal P., Siebielec G. 2020. Wpływ zakwaszenia na funkcje gleb oraz wyznaczanie obszarów ryzyka na użytkach rolnych w Polsce. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 64(18), 31-47. DOI: 10.26114/sir.iung.2020.64.02
198. Smytkiewicz K., Podleśny J., Wielbo J., Podleśna A. 2021. The Effect of a Preparation Containing Rhizobial Nod Factors on Pea Morphological Traits and Physiology. *Agronomy* 2021, 11, 1457. DOI: 10.3390/agronomy11081457.
199. Souza R.P., Machado E.C., Silva J.A.B., Lagoa A.M.M.A., Silveira J.A.G. 2004. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cow-pea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. *Environmental and Experimental Botany*, 51, 45-56.
200. Stanisławska-Głubiak E., Korzeniowska J. 2007. Zasady nawożenia mikroelementami roślin uprawnych. *Studia i Raporty IUNG-PIB Puławy*, 8, 99-110.
201. Stanisławska-Głubiak E. 2009. Nawożenie roślin uprawnych molibdenem. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 18, 27-40.
202. Starck Z. 2007. Rola składników mineralnych w roślinie. W: *Fizjologia roślin*, J. Kopcewicz i S. Lewak (red.), 228-245.
203. Stasiak G., Mazur A., Koper P., Żebracki K., Skorupska A. 2016. Symbioza rizobiów z roślinami bobowatymi (Fabaceae). *Postępy Mikrobiologii*, 55(3), 289-299.
204. Starzyk J., Niewiadomska A., Wolna-Maruwka A., Swędrzyńska D. 2013. Zmiany liczebności *Azospirillum* i *Azotobacter* w glebie pod uprawą kukurydzy (*Zea mays* L.) z zastosowaniem różnych nawozów organicznych. *Fragmenta Agronomica*, 30(4), 147-155.
205. Starzyk J., Swędrzyńska D. 2013. Aktywność nitrogenazy endofitów bakteryjnych w glebie gliniasto-piaszczystej pod uprawą traw. *Łąkarstwo w Polsce*, 16, 99-110.
206. Stasiak G., Mazur A., Koper P., Żebracki K., Skorupska A. 2016. Symbioza rizobiów z roślinami bobowatymi (Fabaceae). *Postępy Mikrobiologii*, 55(3), 289-299.
207. Staszewski Z. 2011. Azot w glebie i jego wpływ na środowisko. *Zeszyty Naukowe - Inżynieria Lądowa i Wodna w Kształtowaniu Środowiska*, 4, 50-58.

208. Streeter J.G. 1994. Failure of inoculant rhizobia to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation. *Canadian Journal of Microbiology*, 40, 513-522.
209. Stryer L., Berg J. M., Tymoczko J. L. 2009. *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
210. Strzelec A. 1988. Symbiotyczne wiązanie wolnego azotu. Cz. I. Znaczenie bakterii symbiotycznych, ich występowanie w glebach i szczepionki RHIZOBIUM dla roślin motylkowatych. *Postępy Nauk Rolniczych*, 4(88), 17-30.
211. Sójkowski Z. 1971. *Udział mikroelementów w metabolizmie roślin*. PWRiL Warszawa.
212. Sujkowska M. 2009. Przebieg procesu infekcji w układzie symbiotycznym rośliny motylkowate- Rhizobium. *Wiadomości Botaniczne*, 53(1/2), 35-53.
213. Sun W.L., Zhao Y.G., Yang M. 2017. Microbial fertilizer improving the soil nutrients and growth of reed in degraded wetland. In: *IOP conference series: earth and environmental science*, 69 (3) international conference on advances in Energy, environment and chemical engineering, 26-28 May 2017, Chengdu, China, 69(1), 012062.
214. Szpunar-Krok E., Pawlak R. 2023. Znaczenie składników odżywczych dla roślin bobowatych grubonasiennych – makroelementy. *Agronomy Science* 78(1), 135–151.
215. Sztuder H. 2009. Ocena efektywności dolistnego dokarmiania wybranych gatunków roślin nawozami płynnymi zawierającymi mikroelementy. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 541(2), 417-424.
216. Szukalski H. 1979. *Mikroelementy w produkcji roślinnej*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, s. 320.
217. Szczygielski J. 1993. Plonowanie mieszanek strączkowo-zbożowych. *Fragmenta Agronomica*, 4, 187-188.
218. Szwejkowska B. 2006. Wpływ sposobu uprawy i reakcja odmian grochu siewnego na wyleganie oraz porażenie przez choroby. *Zeszyty Nauk Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Rolnictwo*, 546(89), 349-357.
219. Timmers A.C., Soupene E., Auriac M.C., Billy F., Vasse J., Boistrad P., Truchet G. 2000. Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 13, 1204.
220. Tisdale S.L., Nelson W.L., Beaton J.D. 1985. *Molybdenum. Soil fertility and fertilizers*. Fourth ed. Macmillan Pub. Co. New York, Collier Macmillan Pub. London, 378-381.

221. Trawczyński C. 2013. Ocena zawartości azotu mineralnego w glebie po zbiorze bulw ziemniaka. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, 267, 87-96.
222. Tsai S., Phillips D. 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores in vitro. *Applied Environmental Microbiology* 5, 1485-1488.
223. Turska-Szewczuk A., Russa R. 2004. Charakterystyka lipopolisacharydów *Rhizobium* i ich znaczenie w procesie symbiozy. *Postępy Mikrobiologii*, 43(4), 434-458.
224. Uchwała Rady Ministrów nr 149/2011 [data dostępu: 10.08.2023r.].
225. Uchwała Rady Ministrów nr 222/2015 [data dostępu: 10.08.2023r.].
226. Van Heerden P.D.R., Swanepoel J.W., Kruger G.H.J. 2007. Modulation of photosynthesis by drought in two desert scrub species exhibiting C3-mode CO<sub>2</sub> assimilation. *Environmental and Experimental Botany*, 61, 124-136.
227. Vance C.P. 1998. Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. In: *The Rhizobiaceae*; H.P. Spink, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas (eds.), Kluwer Academic Publishers, 509-530.
228. Vance C.P., Boylan K.L.M., Stade S. 1987. Host plant determinants of legume nodule function: similarities to plant disease situations. In: S. Nishimure et al. (eds.). *Molecular Determinants of Plant Diseases*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin, 271-287.
229. Velázquez E., Garcia-Fraile P., Ramirez-Bahena M.H., Rivas R., Martinez-Molina E. 2010. Bacteria involved in nitrogen-fixing legume symbiosis: current taxonomic perspective In: *Microbes for Legume Improvement*, M.S. Khan, J. Musarrat, A. Zaidi (eds.), Springer-Verlag, Vienna, 1-25. DOI 10.1007/978-3-211-99753-6\_1.
230. Vieira R.F., Vieira C., Cardoso E.J.B.N., Mosquim P.R. 1998. Foliar application of molybdenum in common bean. II. Nitrogenase and nitrate reductase in a soil of low fertility. *Journal of Plant Nutrition*, 21(10), 2141-1251. DOI: 10.1080/01904169809365550.
231. Vitousek P.M., Menge D.N.L., Reed S.C., Cleveland C.C. 2013. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368, 1621.
232. Voisin A.S., Gueguen J., Huyghe Ch., Jenffroy M.H., Magrini M.B., Meynard J.M., Mougél Ch., Pellerin S., Pelzer E. 2014. Legumes for feed, food, biomaterials and bioenergy in Europe: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34, 361-380.

233. Wais R.J., Keating D.H., Long S.R. 2002. Structure-function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Physiology*, 129, 211-224.
234. Wang D., Yang S., Tang F., Zhu H. 2012. Symbiosis specificity in the legume – rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology*, 14(3), 334–342. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2011.01736.x.
235. Weisany W., Rael Y., Allahverdipour K.H. 2013. Role of some mineral nutrients in biological nitrogen fixation. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Science*, 2(4), 77-84.
236. Wenda-Piesik A. 2011. Wzrost, rozwój, zdrowotność i plonowanie grochu siewnego typu wąskolistnego w zróżnicowanych warunkach fitosanitarnych. *Zeszyty Problemów Postępów Nauk Rolniczych*, 559, 215-227.
237. Weston L.A., Mathesius U. 2013. Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, 39, 283-297. DOI: 10.1007/s10886-013-0248-5.
238. White J., Prell J., James E.K., Poole P. 2007. Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiology*, 144, 604-614. DOI: 10.1104/pp.107.097741.
239. Wielbo J., Skorupska A. 2003. Ewolucja układu symbiotycznego Rhizobium – rośliny motylkowate. *Postępy Mikrobiologii*, 42(3), 263-283.
240. Willems A. 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and Soil*, 283, 3-14. DOI: 10.1007/s11104-006-9058.
241. Williams L.E., Dejong T.M., Philips D.A. 1982. Effect of changes in shoot carbon-exchange rate on soybean root nodule activity. *Plant Physiology*, 69, 432-436.
242. Williams R.J.P., Frausto da Silva J.J.R. 2002. The involvement of molybdenum in life. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292(2), 293-299. DOI: 10.1006/bbrc.2002.6518.
243. Wojcieszka U., Giza A., Wolska E., Łyszcz S. 1993. Dynamika wzrostu i pobierania składników pokarmowych przez groch siewny odmian Ramir i Koral. I. Dynamika przyrostu masy i plon roślin. *Pamiętnik Puławski*, 102, 119-133.
244. Woźniak A. 2013. The yielding of pea (*Pisum sativum* L.) under different tillage conditions. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 12(2), 133-141.
245. Wyniki doświadczeń odmianowych. COBORU 2016-2023.



246. Wysokiński A., Faligowska A., Kalembasa D. 2014. Ilość azotu biologicznie zredukowanego przez łubin żółty (*Lupinus luteus* L.) – wyniki wstępne. *Fragmenta Agronomica*, 31(1), 121-128.
247. Zahran H.H. 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), 968-989. DOI: 10.1128/mmbr.63.4.968-989.1999.
248. Zalewski D., Janiszewska I., Janiszewska K., Kotowicz Z., Wójcik B., Śmiałek E. 2003. Ocena podatności odmian łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.) na *Fusarium* spp. w zależności od warunków klimatyczno-glebowych. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 495, 307-314.
249. Zbieć I., Wojtasik D., Rumasz E., Podsiadło C. 1998. Wpływ deszczowania i nawożenia na procesy fizjologiczne i plonowanie jęczmienia uprawianego na glebie lekkiej. *Fragmenta Agronomica*, 2(58), 63-71.
250. Zhang F., Smith D.L. 1995. Preincubation of Bradyrhizobium japonicum with genistein accelerates nodule development of soybean at suboptimal root zone temperatures. *Plant Physiology*, 108, 961-968.

## Streszczenie/Summary

**Słowa kluczowe:** rośliny strączkowe, groch siewny, azot, biologiczne wiązanie azotu, stres suszy, czynniki Nod, molibden, plon

Powierzchnia uprawy grochu siewnego (*Pisum sativum* L.) w Polsce jest ciągle niewystarczająca. Jest to spowodowane wysoką wrażliwością na zmienne warunki pogodowe oraz niskim i niestabilnym plonem nasion tej rośliny na przestrzeni lat. Dlatego też poszukuje się metod mających na celu poprawę produktywności grochu. Jednym z rozwiązań jest stosowanie cząstek sygnałnych LCOs, które przyczyniają się do usprawnienia procesu symbiotycznego wiązania azotu i tym samym poprawy plonowania grochu.

Celem badań było poszukiwanie metod usprawnienia biologicznej redukcji azotu cząsteczkowego poprzez stosowanie czynników Nod, molibdenu oraz obydwu preparatów łącznie. W doświadczeniu oceniano wpływ wymienionych preparatów na zmniejszenie negatywnego wpływu stresu suszy na wzrost i rozwój roślin grochu oraz plon nasion. Badania prowadzono w latach 2020-2021 w hali wegetacyjnej Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Dwuczynnikowe doświadczenie założono w wazonach Mitscherlicha, zawierających mieszaninę ziemi ogrodowej i piasku w stosunku 5:2. W badaniach uwzględniona została jedna odmiana grochu siewnego Batuta o typie wąsolistnym. W doświadczeniu analizowano wpływ 4 preparatów (obiekt kontrolny - H<sub>2</sub>O, LCOs, Mo, LCOs+Mo) na wzrost, rozwój i plonowanie grochu na dwóch poziomach wilgotności gleby (30% stres suszy oraz 60% - warunki optymalne). Doświadczenie założono w 3 powtórzeniach w układzie kompletnie zrandomizowanym.

Próbki roślin pobierano w 4 fazach rozwojowych grochu (BBCH 18, BBCH 65, BBCH 79, BBCH 89). Określono dynamikę wschodów roślin, dokonano pomiaru ich wysokości oraz oceniono dynamikę i przyrost masy roślin. W fazie kwitnienia (BBCH 65) zmierzono powierzchnię liści, a także dokonano pomiaru parametrów wymiany gazowej, fluorescencji chlorofilu oraz wskaźnika zieloności liści (SPAD). W fazie zielonego strąka (BBCH 79) oraz dojrzałości pełnej (BBCH 89) analizowano wskaźniki biologicznego wiązania azotu. W ostatniej fazie rozwojowej ocenie poddano plon nasion grochu i elementy jego struktury.

Wyniki badań dowiodły, że preparaty LCOs, Mo oraz LCOs+Mo korzystnie wpłynęły na cechy biometryczne i fizjologiczne roślin grochu. Najlepsze efekty uzyskano stosując preparat zawierający mieszaninę rizobialnych cząstek Nod i molibdenu, niezależnie od poziomu uwilgotnienia gleby. Analizowane preparaty korzystnie wpłynęły na wysokość

roślin oraz przyrost masy części nadziemnej i korzeni. Stosowanie omawianych preparatów przed siewem w postaci zaprawy nasiennej usprawniło proces biologicznej redukcji azotu cząsteczkowego przyczyniając się do wzrostu plonu nasion i poprawy elementów jego struktury. W badaniach wykazano, że analizowane preparaty w istotny sposób zredukowały wpływ niekorzystnych warunków środowiska (stres suszy) na wzrost, rozwój i plonowanie grochu siewnego.

**Keywords:** legumes, pea, nitrogen, biological nitrogen fixation, drought stress, Nod factors, molybdenum, yield

The cultivation area of pea (*Pisum sativum* L.) in Poland is still insufficient. This is due to its high sensitivity to changing weather conditions and a low and unstable seed yield of this plant over the years. Therefore, some methods are being sought to improve the productivity of pea. One solution is the use of isolated signature particles of LCOs, which help to improve the process of symbiotic nitrogen fixation and thus improve seed yield of pea.

The aim of this study was to improve the biological reduction of molecular nitrogen by applying preparations of Nod factors, molybdenum and a solution containing of these both preparations. In the experiment was evaluated the effect of the mentioned preparations on minimizing the negative impact of drought stress on growth, development and seed yield. The research was conducted in 2020-2021 in the greenhouse of the Institute of Soil Science and Plant Cultivation - State Research Institute in Puławy. The two-factor experiment was set up in Mitscherlich pots containing a mixture of garden soil and sand in a ratio of 5:2. One pea variety, narrow-leafed Batuta, was use in the experiment. In the experiment was analyzed the effect of 4 preparations: H<sub>2</sub>O (control object) , LCOs, Mo, LCOs+Mo on the growth, development and yield of pea plants at two levels of soil moisture (30% - drought stress and 60% - optimal conditions). The experiment was established in 3 replicates in a completely randomized arrangement.

Plant samples were taken at 4 developmental stages of pea (BBCH 18, BBCH 65, BBCH 79, BBCH 89). During the vegetation period the dynamics of plant emergence was determined and growth and weight gain dynamics were measured. At the flowering stage (BBCH 65), leaf area, parameters of gas exchange, chlorophyll fluorescence and SPAD index were measured. At the green pod stage (BBCH 79) and full maturity (BBCH 89)

indicators of biological nitrogen fixation were analyzed. At the last developmental stage, pea seed yield and elements of its structure were evaluated.

The results proved that the LCOs, Mo and LCOs+Mo formulations had a favorable effect on the biometric and physiological characteristics of pea plants. The best results were obtained after use a solution containing a mixture of rhizobial Nod particles and molybdenum, regardless of the level of soil moisture. The analyzed preparations favorably influenced the height of plants and the weight gain of their aboveground parts and roots. The application of the tested solutions as a seed dressing before sowing improved the process of biological reduction of molecular nitrogen contributing to an increase in seed yield and improvement of elements of its structure. The study showed that the analyzed preparations significantly reduced the impact of adverse environmental conditions (drought stress) on the growth, development and yield of pea.

## OŚWIADCZENIE

ja niżej podpisana

**Karolina Smytkiewicz-Buzak**

**Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych**

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

oświadczam, że praca została napisana przeze mnie samodzielnie:

- 1) a wersja elektroniczna pracy dyplomowej pt.

**„Wpływ czynników Nod i molibdenu na usprawnienie procesu symbiotycznego wiązania azotu i plonowanie grochu siewnego w zróżnicowanych warunkach wilgotności gleby”,**

która została przeze mnie wprowadzona do elektronicznego serwisu Archiwum Prac Dyplomowych wraz z danymi takimi jak: tytuł pracy, imiona i nazwisko autora, promotora oraz recenzentów pracy, streszczenie i słowa kluczowe pracy, jednostka organizacyjna uczelni, data zatwierdzenia tematu, data złożenia pracy oraz recenzje, zgodnie z obowiązującymi w Uniwersytecie procedurami, w związku z obowiązkiem zapewnienia przez Uniwersytet obsługi procesu złożenia i przygotowania pracy dyplomowej do obrony w ramach systemu wspomagającego prowadzenie dokumentacji przebiegu studiów, a także obowiązku prowadzenia repozytorium prac dyplomowych i ich sprawdzania z wykorzystaniem systemu antyplagiatowego, jest wersją ostateczną i jest zgodna z wersją drukowaną przedstawioną do obrony w Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

- 2) Udzielam nieodpłatnie Uniwersytetowi Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie licencji na zwielokrotnianie i udostępnianie tej pracy w ramach serwisu Archiwum Prac Dyplomowych wraz z podstawowymi danymi, takimi jak tytuł, autor, opiekun pracy, streszczenie, słowa kluczowe pracy, w zakresie koniecznym do ochrony mojego prawa do autorstwa lub praw osób trzecich.
- 3) Zapoznałam się z instrukcją dla studentów dotyczącą wprowadzania prac dyplomowych do Archiwum Prac Dyplomowych oraz zawartymi w niej informacjami z zakresu ochrony danych osobowych.
- 4) Wyrażam zgodę na publikację przez Uniwersytet mojego imienia i nazwiska przy mojej pracy dyplomowej na stronie internetowej Uniwersytetu, w związku z funkcjonowaniem Archiwum Prac Dyplomowych.
- 5) Wyrażam zgodę na udostępnianie mojej pracy w czytelni Archiwum UMCS.

Karolina Smytkiewicz-Buzak  
Podpis