

Autoreferat
z działalności naukowo-badawczej

dr Anna Siczek

Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk,
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Lublin 2017

1. Imię i nazwisko

Anna Siczek

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- 11.12.2009** stopień doktora nauk rolniczych w zakresie agronomii – agrofizyki, Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie
- Tytuł rozprawy doktorskiej „Wpływ gęstości gleby i ściółkowania na wzrost systemu korzeniowego i części nadziemnych soi”, promotor prof. dr hab. Jerzy Lipiec
- 16.07.2003** tytuł magistra biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
- Tytuł pracy magisterskiej „Identyfikacja genu *pssL* *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 i opracowanie modelu topologicznego białka PssL”, promotor prof. dr hab. Anna Skorupska
- 27.06.2001** tytuł licencjata biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (wyróżnienie)
- Tytuł pracy licencjackiej „Rośliny transgeniczne”, promotor prof. dr hab. Anna Skorupska
- 5.06.1998** dyplom analityka medycznego, Medyczne Studium Zawodowe im. Stanisława Liebharta w Lublinie (wyróżnienie)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 1.02.2010-obecnie** Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie, Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina, adiunkt
- 15.12.2009-31.01.2010** Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie, Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina, biotechnolog

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311).

* w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/ prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie.

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Cykl publikacji powiązanych tematycznie pt.:

Wpływ flawonoidów, czynników Nod i rizobiów na aktywności mikrobiologiczną gleby i symbiotyczną wybranych roślin bobowatych

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

H1. **Siczek A.**, Lipiec J., Wielbo J., Szarlip P., Kidaj D. Pea growth and symbiotic activity response to Nod factors (lipo-chitooligosaccharides) and soil compaction. 2013. Applied Soil Ecology, 72, 181– 186

IF₂₀₁₃ = 2,206 35 pkt MNiSW

H2. **Siczek A.**, Lipiec J., Wielbo J., Kidaj D., Szarlip P. Symbiotic activity of pea (*Pisum sativum*) after application of Nod factors under field conditions. 2014. International Journal of Molecular Sciences, 15, 7344-7351

IF₂₀₁₄ = 2,862 30 pkt MNiSW

H3. **Siczek A.**, Frąc M., Nawrocka A., Wielbo J., Kidaj D. The response of rhizosphere microbial properties to flavonoids and Nod factors. 2015. Acta Agriculturae Scandinavica Section B - Soil and Plant Science, 65, 125-131

IF₂₀₁₅ = 0,649 20 pkt MNiSW

H4. **Siczek A.**, Lipiec J. Impact of faba bean-seed rhizobial inoculation on microbial activity in the rhizosphere soil during growing season. 2016. International Journal of Molecular Sciences, 17, 784, 1-9

IF₂₀₁₆ = 3,226 30 pkt MNiSW

H5. **Siczek A.**, Frąc M., Wielbo J., Kidaj D. Benefits of flavonoids and straw mulch application on soil microbial activity in pea rhizosphere. 2017. International Journal of Environmental Science and Technology, 1-10, DOI 10.1007/s13762-017-1434-8

IF₂₀₁₆ = 1,915* 30 pkt MNiSW*

Liczba punktów MNiSW publikacji, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **145**

Całkowity IF z roku opublikowania publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **10,858**

Wpływ habilitantki w powstanie ww. prac został przedstawiony w **Załączniku 4**. Oświadczenia współautorów dotyczące ich indywidualnego wkładu w powstanie prac przedstawiono w **Załączniku 7**.

* W przypadku publikacji, dla których nie określono IF oraz punktów MNiSW za rok opublikowania wykorzystano punktację za rok poprzedni

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Mikroorganizmy uczestniczą w szeregu procesów obejmujących obiegu azotu, do których należą: nityfikacja, denityfikacja, amonifikacja, oraz biologiczne wiązanie azotu (BNF, biological nitrogen fixation), które jest ważnym źródłem azotu wprowadzanego do gleby. Proces ten przeprowadzany jest przez mikroorganizmy zw. diazotrofami i zachodzi zarówno w komórkach bakterii wolno żyjących jak: *Klebsiella*, *Azotobacter* czy *Bacillus*, jak i w układach symbiotycznych bakterii z roślinami bobowatymi (*Fabaceae* = *Leguminosae*). Azot jest wiązany symbiotycznie w ilości 100-290 mln ton rocznie, z czego ok 50-70 mln ton w systemach rolniczych, w tym 15-25 mln ton przez bobowate (Herridge i in., 2008).

Symbiotyczne wiązanie azotu odgrywa istotną rolę w rolnictwie, gdyż wiele z roślin bobowatych to rośliny uprawne. Ich włączenie do zmianowania prowadzi do wzrostu żyzności gleby, wzrostu dostępności azotu i fosforu, korzystnych zmian właściwości mikrobiologicznych gleby, zmniejszenia zużycia chemicznych środków ochrony roślin i nawozów sztucznych, a ponadto do wzrostu plonowania roślin następczych (Jensen i in., 2010, Kopke i Nemeck, 2010, Stagnari i in., 2017, von Richthofen, 2006).

Rośliny bobowate mogą korzystać z dwu źródeł azotu: mineralnego asymilowanego z gleby (związanego z aktywnością reduktazy azotanowej) oraz azotu atmosferycznego związanego w brodawkach przez symbiotyczne bakterie dzięki kompleksowi enzymatycznemu nitrogenazy. Symbioza rizobiów z roślinami bobowatymi jest fakultatywna, zachodzi w warunkach, gdy azot glebowy nie wystarcza na zaspokojenie potrzeb rośliny, a proces brodawkowania kontrolowany jest na wielu etapach, zarówno przez geny roślinne, jak i bakteryjne.

Uważa się, że rośliny bobowate mają potencjał aby w całości pokryć zapotrzebowanie na azot do wzrostu i rozwoju w procesie biologicznego wiązania azotu atmosferycznego. Pomimo tego, niesprzyjające warunki glebowe i środowiskowe, które ograniczają wzrost roślin, obniżają potencjał wiązania azotu. Wśród nich najważniejsze to dostępność wody, temperatura, ilość dostępnego azotu, zasolenie, zakwaszenie, zagęszczenie gleby, obecność wysokowydajnych szczepów rizobiów (Carranca i in., 1999, Lira i in., 2005, Mastrodomenico i in., 2013, Siczek i Lipiec, 2011, Unkovich i in., 1996).

Ilość związanego azotu przez bobowate jest zróżnicowana dla poszczególnych gatunków (Carranca i in., 1999). Wśród głównych roślin bobowatych klimatu chłodnego (bobik, groch i ciecierzycy), bobik wykazywał najwyższe wartości udziału azotu pochodzącego z atmosfery (%Ndfa, nitrogen derived from the atmosphere) oraz ilości N związanego symbiotycznie w pędach (średnio 74% i 153 kg N ha⁻¹). U grochu wartości te wynosiły średnio odpowiednio 60% i 130 kg N ha⁻¹ (Jensen i in., 2010). W innych badaniach ilość związanego azotu przez bobik wyniosła od 19 do 97% Ndfa, a zawartość azotu w pędach 12-330 kg ha⁻¹ (Unkovich i Pate, 2000). Ze względu na duże możliwości produkcyjne roślin bobowatych i jednocześnie dość wysoką zmienność plonowania w latach, poszukiwane są sposoby zwiększające ich potencjał produkcyjny.

Strefa korzeniowa roślin to miejsce intensywnej oddziaływań pomiędzy rośliną a mikroorganizmami i zarazem miejsce wstępnej wymiany sygnałów chemicznych. Interakcje pomiędzy bakteriami a rośliną prowadzące do nawiązania oddziaływań symbiotycznych są

wysoco specyficzne i polegają na wymianie związków chemicznych, z których kluczową rolę odgrywają roślinne flawonoidy i rizobiowe czynniki Nod.

Flawonoidy, wtórne metabolity, pochodne 2-fenylo-1,4 benzopirenu, syntetyzowane są przez wiele roślin, ale nie przez bakterie. Przedostają się do gleby w postaci wydzielin korzeniowych, oraz w efekcie rozkładu korzeni czy ich uszkodzenia. W odniesieniu do rizobiów są chemoatraktantami powodującymi przemieszczanie rizobiów do korzeni gospodarza, wpływają na wzrost mikrosymbiontów, a ponadto (razem z regulatorowym białkiem NodD) są induktorami ekspresji genów *nod*, kodujących enzymy odpowiedzialne za syntezę lipochitooligosacharydów (LCO, czynników Nod), które indukują infekcję korzeni oraz tworzenie brodawek (Cooper, 2004). Co więcej, flawonoidy regulują tworzenie i rozwój brodawek korzeniowych przez wpływ na transport auksyn, jak też podziały komórkowe w tkankach roślinnych. Flawonoidy pełnią rolę ochronną przed chorobami roślin oraz wpływają na cykl N, P, S i mikroskładników (Cesco i in., 2012, Dakora i Phillips 1996, Hassan i Mathesius, 2012).

Różne gatunki roślin wydzielają określony zestaw flawonoidów, a ich jakość zmienia się zależnie od fazy rozwojowej rośliny (Guo i in., 2011). Rizobia są zaadaptowane do rozpoznawania flawonoidów wydzielanych przez swoich kompatybilnych gospodarzy. Chemiczna budowa flawonoidów oraz czynników Nod jest po części odpowiedzialna za specyficzność oddziaływań mikrosymbiont-roślinny gospodarz. Na rizobia oddziałują już bardzo niskie stężenia flawonoidów rzędu 10^{-6} – 10^{-7} M (Begum i in., 2001).

Skład roślinnych flawonoidów może zmieniać się zależnie od dostępności składników odżywczych jak azot, potas, fosfor, jak i obecność symbionta. Synteza flawonoidów i ich wydzielanie do ryzosfery przez korzenie roślin ulegają obniżeniu w warunkach niskiej temperatury, co skutkuje opóźnieniem infekcji włóśników korzeniowych, oraz procesów tworzenia brodawek i wiązania azotu, a tym samym obniżeniem biomasy roślin i liczby brodawek (Lira i in., 2005). Dodatek specyficznych flawonoidów na powierzchnię nasion lub do gleby w takich warunkach niwelował szkodliwe oddziaływanie niskiej temperatury w doświadczeniu laboratoryjnym (Begum i in., 2001). Mikroorganizmy strefy korzeniowej roślin, w tym patogeny, mikroorganizmy promujące wzrost roślin (PGPR, plant growth promoting rhizobacteria), jak też czynniki abiotyczne jak klimat, temperatura i wilgotność gleby, wpływają na rodzaj wydzielanych flawonoidów (Dardanelli i in., 2010).

Do tej pory w kilku badaniach testowano oddziaływanie flawonoidów na wzrost roślin. Preinkubacja *R. leguminosarum* flawonoidami przed inokulacją nasion grochu

prowadziła do korzystnych zmian w brodawkowaniu i liczbie strąków (Begum i in., 2001). W innych badaniach, inkubacja *R. leguminosarum* bv. *trifolii* wydzielinami korzeniowymi koniczyny zawierającymi flawonoidy przyczyniła się do wzrostu masy pędów i liczby brodawek (Maj i in., 2010). Dodatkowo, korzystny wpływ flawonoidów na rośliny bobowate był widoczny w warunkach stresowych. Dodatek genisteiny do hodowli *Bradyrhizobium* zwiększał brodawkowanie, wiązanie azotu, tempo fotosyntezy, przewodnictwo aparatów szparkowych i tempo transpiracji soi w warunkach stresu solnego (Dolatabadian i in., 2012, Fokom i in., 2010).

Molekularnym łącznikiem pomiędzy symbiotycznymi rizobiami a roślinnym gospodarzem jest bakteryjne białko NodD. Działa ono jako sensor roślinnych flawonoidów i zarazem aktywator transkrypcji genów brodawkowania *nod*, które kodują enzymy i białka biorące udział w syntezie czynników Nod (NF, Nod factors). Gen *nod* kodujący białko NodD ulega ekspresji konstytutywnie zarówno u bakterii wolno żyjących, jak i współżyjących w symbiozie. Wiązanie NodD do promotorów nie wymaga obecności koinduktora, ale przyłączenie flawonoidów poprzez zmianę konformacyjną umożliwia rozpoczęcie transkrypcji.

Czynnik Nod zbudowany jest ze szkieletu od 3 do 6 reszt N-acetylo-D-glukozamin (GlcNAc) połączonych wiązaniem β -1,4, modyfikowanym specyficznym zarówno z redukującego, jak i nieredukującego końca. Czynniki Nod są morfogenami, które indukują szereg procesów obserwowanych w komórkach roślinnych w epidermie, korze i perycyklu. W bardzo niskich stężeniach (10^{-9} – 10^{-12} M) wywołują deformację i skręcanie włósników korzeniowych (etap niezbędny do wnikięcia rizobiów do korzeni). Ponadto czynniki Nod potrzebne są do prawidłowego rozwoju nici infekcyjnej – struktury umożliwiającej rizobiom penetrację korzeni i dotarcie do tworzących się brodawek korzeniowych. NF powodują, że komórki kory zewnętrznej wchodzi w cykl komórkowy ale nie dzielą się, natomiast komórki kory wewnętrznej ulegają podziałom tworząc zawiązki brodawek (D’Haeze i Holsters, 2002). Wykazano, iż NF wpływają również na stężenie fitoaleksyn w tkankach roślinnych (Dakora, 2003) i ekspresję genów kodujących enzymy zaangażowane w produkcję izoflawonoidów. Schmidt i in. (1994) zaobserwowali zwiększenie koncentracji flawonoidów w wydzielinach korzeni w wyniku aplikacji czynników Nod. Co więcej, Nod Bj-V ($C_{18:1}$, MeFuc) indukowały odporność soi na mączniaka rzekomego powodowanego przez *Microsphaera diffusa* a także stymulowały kolonizację korzeni przez arbuskularne grzyby mykoryzowe (AMF, arbuscular mycorrhizal fungi) (Duzan i in., 2005, Xie i in., 1997).

Synteza czynników Nod uzależniona jest od temperatury. W niskiej temperaturze ich produkcja i wydzielanie przez *R. leguminosarum* bv. *trifolii* są zakłócone, co związane jest z transkrypcją, translacją i post-translacyjnymi modyfikacjami (McKay i Djordjevic, 1993). Zastosowanie NF w warunkach niskiej temperatury i niskiego pH niwelowało szkodliwy wpływ tych czynników na skręcanie włóśników korzeniowych, czego nie obserwowano dla silnego zasolenia (Duzan i in., 2004). Korzystne efekty dolistnego stosowania NF obserwowano w warunkach umiarkowanego stresu wodnego w odniesieniu do tempa fotosyntezy i transpiracji, liczby kwiatów i strąków (Atti i in., 2005).

Działanie NF zaobserwowano również w przypadku innych niż bobowate, ważnych roślin uprawnych jak kukurydza, bawełna i jęczmień, u których przyspieszały kiełkowanie i powodowały wzrost masy korzeni i pędów, czy długości korzeni (Miransari i Smith, 2009, Prithiviraj i in., 2003). Wiadomo, że czynniki Nod wspomagają wczesną somatyczną embriogenezę roślin nie zaliczanych do strączkowych, nawet w przypadku braku auksyn i cytokinin (Dyachok i in., 2000).

Rizobia zaliczane są do mikroorganizmów wywierających korzystny wpływ na wzrost roślin (PGPR, plant growth-promoting rhizobacteria). Mikroorganizmy te pełnią szereg funkcji, do których należą głównie: udostępnianie składników pokarmowych, wytwarzanie substancji biologicznie czynnych o charakterze regulatorów wzrostu, poprawa struktury gleby oraz regulacja procesu wydzielania związków przez korzenie. Szczepienie nasion rizobiami stymuluje produkcję fitohormonów, sideroforów i HCN, a także modyfikuje strukturę i różnorodność mikroorganizmów, promując rozwój innych PGPR. Badania wykazały wzrost dostępności fosforu oraz pobierania P, N i Fe przez sałatę i marchew po inokulacji *R. leguminosarum* (Trabelsi i in., 2011, 2012, Yadav i Verma, 2014). Ponadto odnotowano korzystne zmiany wielu parametrów roślin (masa brodawek, pędów, plon, wiązanie azotu) zwłaszcza przy jednoczesnej inokulacji z innymi mikroorganizmami zaliczanymi do PGPR jak *Bacillus*, *Pseudomonas* czy *Trichoderma* (Korir i in., 2017, Sánchez i in., 2014, Yadav i Verma, 2014). Rizobia pełnią rolę ochronną przed patogenami roślin bobowatych oraz innych roślin uprawnych, poprzez indukowaną odporność systemiczną ISR (Induced Systemic Resistance). Wykazano ich korzystne działanie w przypadku infekcji gleby przez *Rhizoctonia solani* czy *Pythium* spp., w odniesieniu do bobiku, grochu, soczewicy czy buraków cukrowych (Bardin i in., 2004, Farfour i Al-Saman 2014, Huang i Erickson, 2007).

Cel naukowy

Celem naukowym badań stanowiących osiągnięcie naukowe było określenie wpływu flawonoidów produkowanych przez rośliny bobowate, czynników Nod izolowanych z bakterii *R. leguminosarum* oraz szczepionki bakterii *Rhizobium* na aktywność mikrobiologiczną gleby oraz aktywność symbiotyczną grochu i bobiku. Oddziaływanie tych czynników określono w odniesieniu do:

- aktywności enzymów glebowych oraz liczebności i zróżnicowania metabolicznego mikroorganizmów ryzosfery (prace H3, H4, H5)
- parametrów i aktywności brodawek korzeniowych (prace H1, H2)
- reakcji części nadziemnych, korzeni i plonowania roślin (prace H1, H2).

Ograniczona wiedza na temat oddziaływania czynników Nod, flawonoidów oraz szczepionki *Rhizobium* na własności mikrobiologiczne gleby, jak również brak informacji na temat oddziaływania czynników Nod na plonowanie roślin w naturalnych warunkach polowych, uzasadniają podjęcie powyższego problemu badawczego.

Ocena oddziaływania flawonoidów i czynników Nod na wybrane właściwości mikrobiologiczne gleby

Oprócz udziału w oddziaływaniach symbiotycznych rizobiów z roślinami bobowatymi, flawonoidy (F) pełnią również istotną funkcję w komunikacji między roślinami i mikroorganizmami, wroście drobnoustrojów i ich aktywności. Wykazano, że działają one jako wczesne sygnały zarówno dla rizobiów, jak i dla arbuskularnych grzybów mykoryzowych (AMF) (Antunes i in., 2006). W stężeniu $1 \mu\text{g g}^{-1}$ suchej masy gleby są zdolne do wywołania zmian struktury mikroorganizmów (Guo i in., 2011). Odnotowano dodatnią korelację między stężeniem genisteiny i fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (PLFA), grzybami, bakteriami, w tym Gram (+) i tlenowymi, czy też zawartością węgla biomasy mikrobiologicznej (Guo i in., 2011, Wang i in., 2012). Flawonoidy stymulowały międzykomórkową kolonizację korzeni ryżu przez *Azorhizobium caulinodans* (Jain i Gupta, 2003) oraz kolonizację wspięgi wężowatej przez AMF (Fokom i in., 2010).

W literaturze brakuje informacji odnośnie wpływu czynników Nod na właściwości mikrobiologiczne gleby.

Badania przedstawione w publikacjach **H3 i H5** podjęto celem oszacowania wpływu flawonoidów oraz czynników Nod na aktywność enzymatyczną, liczebność mikroorganizmów i ich zróżnicowanie funkcjonalne w glebie. Dodatkowym celem było

określenie czy i w jakim zakresie dochodzi do zmian w składzie grzybów pod wpływem flawonoidów. Oprócz tego, w omawianych publikacjach sprawdzono, czy jednocześnie zastosowanie flawonoidów oraz czynników Nod może wzmacniać lub osłabić ich indywidualne oddziaływanie na analizowane parametry (praca **H3**), a także, czy oddziaływanie flawonoidów może być modyfikowane przez ściółkę ze słomy (praca **H5**).

Badania prowadzono w doświadczeniu polowym na glebie płowej wytworzonej z lessu. Flawonoidy izolowano z kiełkujących nasion grochu za pomocą octanu etylu. W tym celu powierzchniowo wyjałowione nasiona grochu wytrząsano w jałowej wodzie bez dostępu światła. Następnie do supernatantu dodano octan etylu i ekstrahowano flawonoidy z fazy wodnej. Po odparowaniu octanu etylu, osad zawierający flawonoidy został rozpuszczony w 95% etanolu. Stężenie F obliczono z maksimum absorpcji wykorzystując prawo Lamberta-Beera. Widmo absorpcji wskazało na obecność izoflawonów genisteiny i/lub biochininy A. Stężenie flawonoidów wynosiło 32,2 μM .

Syntezę czynników Nod przez *R. leguminosarum* bv. *viciae* GR09 indukowano przez dodanie flawonoidów w stężeniu 10 μM do płynnej kultury bakterii na pożywce TY. Aby wyizolować czynniki Nod, komórki bakterii usunięto przez wirowanie, po czym NF ekstrahowano z supernatantu n-butanolem (Prithiviraj i in., 2003). Frakcję organiczną oddzielono i wysuszono. Stężenie czynników Nod określono przez konwersję aminocukrów do glikozydów metyloowych za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MS). Założono, że pojedyncza cząsteczka czynnika Nod zawiera średnio cztery reszty N-acetyloglukozaminy (GlcNAc). Stężenie GlcNAc w roztworze czynników Nod wyniosło 260 nM. Nasiona grochu (*Pisum sativum* L.) moczono w roztworze czynników Nod (NF), w roztworze flawonoidów (F) lub w mieszaninie obu związków (NF+F), natomiast w obiekcie kontrolnym nasiona moczono w wodzie. Ściółkę ze słomy pszennej zastosowano na powierzchnię gleby kilka dni po siewie grochu. Analizy biochemiczne i mikrobiologiczne (aktywność enzymów, różnorodność funkcjonalna bakterii, liczebność mikroorganizmów oraz identyfikacja dominujących grzybów) wykonano w glebie pobranej ze strefy korzeniowej grochu w fazach 5-6 liści (T1), kwitnienia (T2) i wykształcania strąków (T3).

Badania wykazały istotny i korzystny wpływ flawonoidów (F) na aktywność dehydrogenaz, enzymów odzwierciedlających ogólną aktywność gleby (Tabele 1 i 2). Wpływ ten był większy w późniejszych fazach rozwoju roślin niż w fazie 5-6 liści. Wpływ F na aktywność proteazy zaznaczył się w mniejszym stopniu niż w przypadku dehydrogenaz, ale również był istotny. Po zastosowaniu czynników Nod (NF) w ryzosferze grochu

obserwowano istotnie ($p < 0,05$) wyższą niż w obiekcie kontrolnym średnią (z trzech terminów pomiarowych) aktywność proteazy (praca H3). W poszczególnych fazach rozwoju odnotowano brak zmian lub też wzrost aktywności dehydrogenaz (T2) i fosfomonoesterazy kwaśnej (T1) w glebie z dodatkiem czynników Nod. Nie stwierdzono istotnych zmian w aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej po zastosowaniu flawonoidów.

Tabela 1. Aktywności enzymów glebowych oraz wskaźniki różnorodności funkcjonalnej po zastosowaniu flawonoidów i ściółki. Różne litery oznaczają istotne różnice ($p < 0,05$). K obiekt kontrolny, F flawonoidy, S ściółka, CLPP community level physiological profiles, AWCD average well colour development, S Richness, H Shannon–Weaver, E Evenness. Na podstawie H5

Faza rozwoju	Obiekty	Enzymy			CLPP			
		Dehydrogenazy ($\text{cm}^3 \text{H}_2 \text{kg}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Proteaza (mg tyrozyny $\text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Fosfomonoesteraza kwaśna ($\text{mmol PNP kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	AWCD	S	H	E
5-6 liści	K	3,52 f	2,51 e	24,22 d	0,723 f	28,0 b	3,31 abc	0,99 b
	F	4,44 ef	3,62 cde	27,88 cd	0,545 g	25,3 c	3,27 bc	1,01 b
	S	4,16 ef	3,68 cde	24,46 d	0,896 cde	29,3 ab	3,35 abc	0,99 b
	F+S	4,57 ef	3,69 cde	26,58 cd	0,924 bcd	29,3 ab	3,36 ab	0,99 b
Kwitnienie	K	5,30 e	3,08 de	36,91 a	1,00 ab	29,7 a	3,25 c	0,96 c
	F	7,82 d	4,63 bcd	34,20 ab	0,96 abc	30,3 a	3,40 a	1,00 b
	S	9,44 dc	3,60 cde	36,94 a	0,86 de	30,0 a	3,39 a	1,00 b
	F+S	8,80 bcd	5,02 abc	34,65 a	0,84 de	29,0 ab	3,36 ab	1,00 b
Wykształcanie strąków	K	8,23 cd	5,41 ab	32,57 ab	0,71 f	29,7 a	3,36 ab	0,99 b
	F	9,91 b	6,16 ab	30,22 bc	0,33 h	22,3 d	3,25 c	1,05 a
	S	9,29 bc	5,48 ab	36,69 a	0,81 ef	29,0 ab	3,30 abc	0,98 bc
	F+S	13,13 a	6,39 a	33,85 ab	1,03 a	30,0 a	3,38 a	0,99 b

Tabela 2. Aktywności enzymów oraz liczebności mikroorganizmów glebowych po zastosowaniu flawonoidów i czynników Nod (średnia z trzech terminów pomiarowych). Różne litery oznaczają istotne różnice ($p < 0,05$). Na podstawie H3

Parametry	Obiekt kontrolny	Flawonoidy	Czynniki Nod	Flawonoidy+Nod
Dehydrogenazy ($\text{cm}^3 \text{H}_2 \text{kg}^{-1} \text{d}^{-1}$)	2,70 b	3,94 a	2,87 b	3,71 a
Proteaza (mg tyrozyny $\text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	4,59 b	5,60 ab	6,27 a	7,03 a
Fosfataza kwaśna ($\text{mmol PNP kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	22,1 a	25,0 a	27,5 a	25,0 a
Grzyby (10^4jtk g^{-1})	111,4 a	85,0 b	72,8 bc	64,9 c
Bakterie (10^7jtk g^{-1})	76,2 c	105,4 ab	90,8 cb	110,0 a
<i>Pseudomonas</i> (10^7jtk g^{-1})	67,3 b	121,6 a	131,2 a	150,8 a
<i>Bacillus</i> (10^7jtk g^{-1})	61,6 d	86,1 c	99,5 b	116,6 a

Warto podkreślić fakt, że równoczesne zastosowanie flawonoidów i ściółki zwiększało aktywność dehydrogenaz i proteazy w odniesieniu do obiektu kontrolnego i, co więcej, w

odniesieniu do F (dehydrogenazy, faza wykształcania strąków) (praca **H5**). Podobnie równoczesne zastosowanie F i NF istotnie podwyższyło aktywność proteazy w stosunku do obiektu kontrolnego. Uzyskane wyniki wskazują na to, że stosowanie flawonoidów na nasiona grochu oraz równoczesne ściółkowanie gleby może mieć istotny wkład w cykl N, a tym samym dostarczanie składników odżywczych do wzrostu mikroorganizmów i roślin. Dehydrogenazy, które występują wewnątrzkomórkowo we wszystkich żyjących mikroorganizmach, odgrywają istotną rolę w utlenianiu glebowej materii organicznej (OM) (Zhang i in., 2010). Jeśli chodzi o proteazy, wzbogacają one ekosystemy w N, a proteoliza uważana jest za etap limitujący tempo mineralizacji azotu w glebach. Szacunkowo około 40% całkowitego azotu glebowego to azot białkowy (Schulten i Schnitzer, 1998).

Różnorodność funkcjonalna gleby zmieniała się pod wpływem flawonoidów w sposób zależny od fazy rozwoju roślin (**H5**). Wskaźniki różnorodności AWCD (average well colour development) i R (Richness) były niższe w ryzosferze roślin traktowanych flawonoidami w fazach 5-6 liści oraz wykształcania strąków, podczas gdy wartości wskaźnika E (Evenness) były wyższe w fazach kwitnienia i wykształcania strąków niż w obiekcie kontrolnym. Jednoczesne zastosowanie flawonoidów oraz ściółki zwiększało istotnie wartości AWCD w fazach 5-6 liści oraz wykształcania strąków, natomiast w fazie kwitnienia obniżało je w porównaniu z obiektem kontrolnym. Zmiany te były powiązane z wymywaniem składników pokarmowych do głębszych warstw gleby podczas rozkładu ściółki.

Na podstawie uzdolnień mikroorganizmów do wykorzystania substratów węglowych wyróżniono dwie grupy obiektów (kryterium Sneath'a 66%). W jednej grupie znalazły się obiekty kontrolny i z flawonoidami w fazach T1 i T3, natomiast w drugiej grupie pozostałe obiekty.

Flawonoidy wywarły istotny wpływ na liczebność grzybów zmniejszając ich populację w fazie wykształcania strąków. Ogólna liczebność bakterii oraz liczebności bakterii z rodzajów *Bacillus* i *Pseudomonas* wzrosły (praca **H3**) lub nie zmieniały się istotnie po zastosowaniu F (praca **H5**) (Tabele 2 i 3). Podobnie istotne zmiany liczebności drobnoustrojów zaobserwowano w wyniku aplikacji czynników Nod (praca **H3**). Populacja grzybów w dużym stopniu wzrosła ($p < 0,05$) w fazach 5-6 liści oraz kwitnienia a następnie zmalała pod koniec wegetacji w glebie z czynnikami Nod w odniesieniu do obiektu kontrolnego. Wyraźny wpływ czynników Nod na wzrost liczebności *Bacillus* i *Pseudomonas* wykazano w początkowej fazie rozwoju grochu.

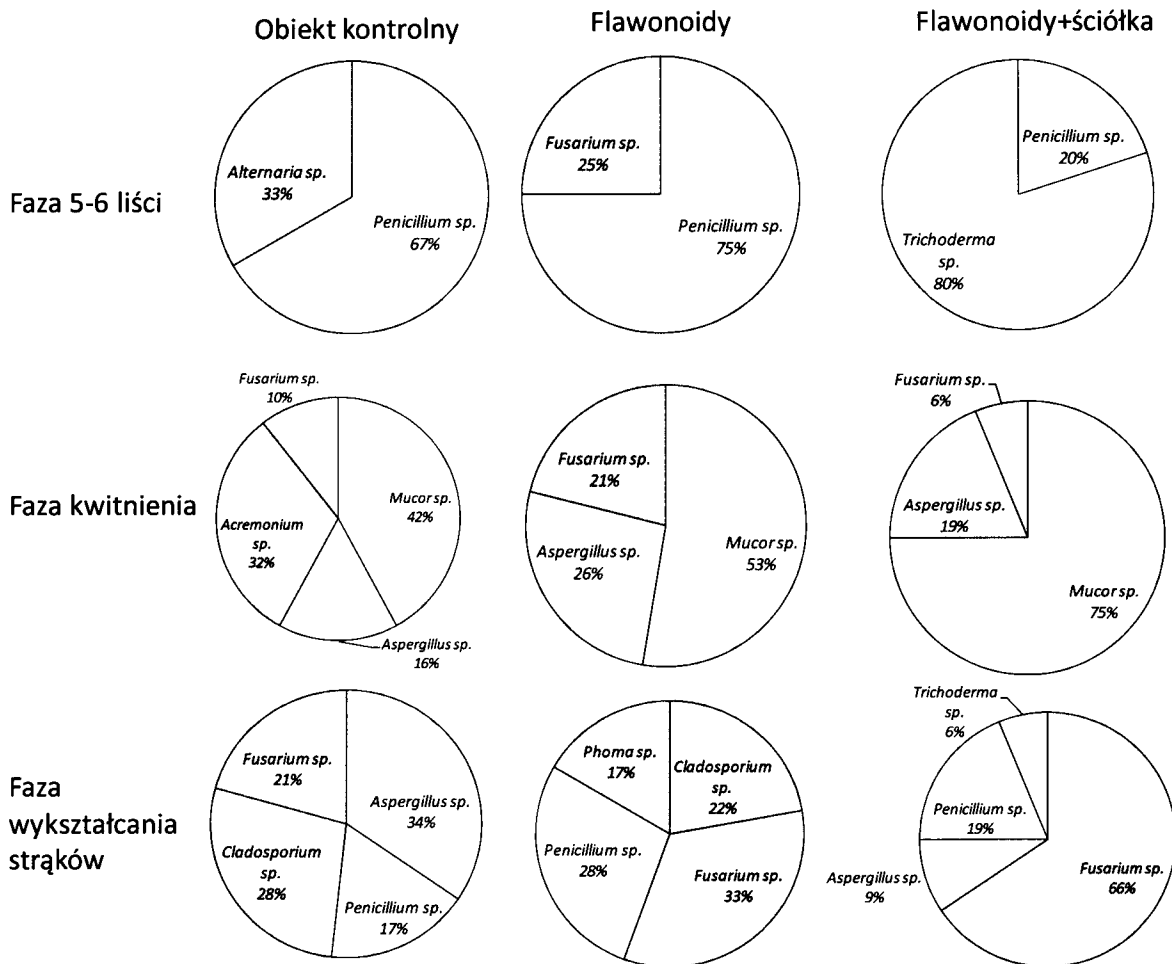
Tabela 3. Liczebności mikroorganizmów glebowych po zastosowaniu flawonoidów i ściółki. Różne litery oznaczają istotne różnice ($p < 0,05$). Na podstawie H5

Faza rozwoju	Obiekty	Grzyby (jtk 10^3 g ⁻¹)	Bakterie (jtk 10^7 g ⁻¹)	<i>Bacillus</i> (jtk 10^7 g ⁻¹)	<i>Pseudomonas</i> (jtk 10^7 g ⁻¹)
5-6 liści	Kontrolny	19,9 e	72,3 a	60,3 h	86,2 bcd
	Flawonoidy	30,0 e	175,9 a	82,8 gh	110,2 bc
	Ściółka	38,8 e	69,5 a	164,0 def	137,1 ab
	Flawonoidy+ściółka	47,6 e	232,8 a	177,2 de	51,1 d
Kwitnienie	Kontrolny	530,7 bc	262,5 a	264,8 c	85,0 bcd
	Flawonoidy	397,9 cd	169,8 a	213,3 cd	67,9 cd
	Ściółka	153,5 de	307,1 a	347,0 b	72,7 cd
	Flawonoidy+ściółka	791,3 ab	262,1 a	443,5 a	79,6 cd
Wykształcanie strąków	Kontrolny	971,8 a	75,9 a	113,9 efgh	89,6 bcd
	Flawonoidy	641,2 bc	138,4 a	84,5 fgh	102,0 bcd
	Ściółka	840,3 ab	287,3 a	122,8 efgh	164,5 a
	Flawonoidy+ściółka	1094,9 a	96,4 a	143,9 defg	169,4 a

Z ryzosfery grochu wyizolowano grzyby potencjalnie fitopatogenne (*Fusarium*, *Cladosporium*, *Acremonium*, *Alternaria* oraz *Phoma*) i potencjalnie antagonistyczne (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* i *Trichoderma*) (H5). Flawonoidy wywołały ilościowe i jakościowe zmiany w składzie grzybów, a ich wpływ uzależniony był od fazy rozwoju grochu (Rys. 1). W fazach 5-6 liści oraz kwitnienia prowadziły one do wzrostu udziału grzybów antagonistycznych w ryzosferze w porównaniu z obiektem kontrolnym, odwrotną zależność obserwowano w fazie wykształcania strąków. Warto podkreślić, że zastosowanie F razem ze ściółką w większym stopniu zmieniło skład dominujących grzybów w ryzosferze, niż zastosowanie wyłącznie flawonoidów, niezależnie od fazy rozwoju grochu. W obiekcie Flawonoidy + Ściółka w fazie 5-6 liści dominowały grzyby antagonistyczne, natomiast w fazie kwitnienia grzyby antagonistyczne stanowiły aż 94% wśród dominujących rodzajów (dla porównania w obiekcie kontrolnym wartości te wyniosły odpowiednio 67 i 58%).

Bacillus i *Pseudomonas* spp. znane są jako bakterie promujące wzrost roślin (PGPR). Te korzystne mikroorganizmy mogą hamować wzrost lub aktywność grzybów i bakterii chorobotwórczych poprzez niekorzystny wpływ na ich populację i aktywność metaboliczną (Raaijmakersi in., 2009, Sang i Kim, 2012). Niektóre gatunki tych bakterii pozytywnie oddziałują na wzrost, plon i aktywność symbiotyczną roślin bobowatych (Zahir i in., 2011). Można się spodziewać, że wysoka populacja antagonistycznych *Bacillus*, *Pseudomonas* czy *Trichoderma* w glebie na skutek aplikacji czynników Nod, flawonoidów i ściółki może

proceed to the reduction of the population of phytopathogens, as well as to the improvement of the growth and yield of plants.



Rys. 1. Dominujące rodzaje grzybów w ryzosferze grochu. Na podstawie H5 oraz danych niepublikowanych

To explain the dependence between objects and analyzed variables, a principal component analysis (PCA) was conducted. The first two principal components explained 77%, 85% and 79% of the variance in the primary variables in the control object, with flavonoids and with flavonoids and mulch (H5). PCA analysis showed the greatest influence of AWCD, population of *Bacillus* and richness index (S) on the first principal component, both in the control object, as well as with flavonoids. These variables were positively correlated with each other, whereas in the control object they were positively correlated with the first component, and in the F object – negatively correlated. The second component in these objects represented dehydrogenase and protease.

Natomiast dehydrogenazy, proteaza i populacja bakterii *Pseudomonas* charakteryzowały się najwyższymi wartościami współrzędnych czynnikowych w obiekcie ściółkowanym z flawonoidami. Wymienione zmienne pierwotne reprezentowane były dobrze przez pierwszą składową, z którą były ujemnie skorelowane. Wykazano, że H (wskaźnik Shannona) był powiązany z wszystkimi obiektami oprócz obiektu kontrolnego.

Badania przedstawione w pracach **H3** i **H5** pozwoliły prześledzić dynamikę aktywności mikrobiologicznej w ryzosferze grochu pod wpływem czynników Nod oraz flawonoidów (zastosowanych również w połączeniu ze ściółką). Wyniki wskazały na istotną rolę badanych związków w intensyfikacji aktywności enzymów glebowych oraz w rozwoju populacji mikroorganizmów mających potencjalnie korzystny wpływ na jakość gleby i roślin.

Odpowiedź roślin na czynniki Nod

Czynniki Nod są związkami sygnałnymi, które biorą udział w oddziaływaniach pomiędzy rośliną a symbiotycznymi bakteriami *Rhizobium*. W dotychczasowych badaniach analizowano wpływ czynników Nod zastosowanych na nasiona lub do podłoża hodowlanego głównie w kontrolowanych warunkach (doświadczenia wazonowe). Wykazano, że czynniki Nod znacznie przyspieszały kiełkowanie nasion, wzrost siewek oraz zwiększały masę roślin i liczbę strąków, jak też liczbę brodawek, które zasiedlane były głównie przez autochtoniczne szczepy rizobiów (Maj i in., 2009). Warto dodać, że czynniki Nod w większym stopniu przyczyniły się do wzrostu masy korzeni (1,64 krotnie), niż pędów (1,37 krotnie). Czynniki Nod wpływały na poziom różnorodności genetycznej rizobiów kolonizujących brodawki grochu i wyki (Kidaj i in., 2012). Dolistne stosowanie NF podwyższało tempo fotosyntezy, powierzchnię liści i suchą masę soi w porównaniu z roślinami kontrolnymi (Almaraz i in., 2007, Khan i in., 2008).

Nadmierne zagęszczenie gleby w obrębie strefy korzeniowej roślin pojawia się przede wszystkim w wyniku przejazdów ciężkich maszyn i pojazdów rolniczych, a także intensywnej uprawy roli, z pominięciem roślin strukturotwórczych (bobowate) w zmianowaniu. Jego niekorzystne efekty to zmiany struktury i porowatości gleby wpływające na właściwości cieplne, natlenienie i uwilgotnienie, przebieg procesów biologicznych, a w konsekwencji na wzrost roślin (Gregorich i in., 2011, Nosalewicz i Lipiec, 2014, Pengthamkeerati i in., 2011, Siczek i Frąć, 2012). Nadmierny stan zagęszczenia gleby może zmieniać ilość azotu dostarczanego do gleby przez oddziaływania symbiotyczne rizobiów z roślinami bobowatymi.

Jego szkodliwy efekt stwierdzono w odniesieniu do plonu nasion i białka soi (Botta i in., 2010) i może on być uzależniony od wilgotności gleby (Buttery i in., 1998) czy też ściółkowania gleby (Siczek i Lipiec, 2011). Wysoki stan zagęszczenia gleby skutkował zmianami w rozmieszczeniu brodawek na systemie korzeniowym, jak również zwiększonym udziałem dużych brodawek oraz większą masą pojedynczej brodawki w odniesieniu do gleby umiarkowanie zagęszczonej i luźnej (Siczek i Lipiec, 2011).

Badania opisane w publikacji **H1** przeprowadzono w celu określenia wpływu czynników Nod na aktywność symbiotyczną i wzrost grochu w warunkach optymalnego i wysokiego stanu zagęszczenia gleby. Podjęto próbę odpowiedzi na pytanie, czy i w jakim stopniu czynniki Nod mogą modyfikować skutki wysokiego zagęszczenia gleby na parametry roślin grochu. Glebę (płowa wytworzona z lessu) pobrano z warstwy ornej (0-20 cm) z pola uprawnego i zagęszczono do gęstości optymalnej dla wzrostu roślin ($1,30 \text{ g cm}^{-3}$) oraz do gęstości ograniczającej wzrost i funkcjonowanie roślin ($1,55 \text{ g cm}^{-3}$).

Syntezę czynników Nod (NF) przez *R. leguminosarum* bv. *viciae* GR09 zaindukowano przez dodanie flawonoidów ekstrahowanych z kiełkujących nasion grochu. Czynniki Nod zastosowano na nasiona grochu aby zwiększyć ich stężenie w pobliżu siewek roślin. Prowadzi to w rezultacie do zwiększenia liczby miejsc, w których dochodzi do podziałów kory korzenia, a następnie do tworzenia zawiązków brodawek. Analizy (biomasa roślin, powierzchnia liści, aktywność nitrogenazy, liczebność, powierzchnia i masa brodawek oraz całkowita zawartość azotu w roślinie) wykonano w fazie kwitnienia grochu.

W pracy wykazano, że pod wpływem czynników Nod istotnie wzrosły średnie wartości: wysokości, suchej masy pędów i powierzchni liści jak również masy oraz długości korzeni grochu (Tabela 4). Nie zmieniły się istotnie średnica korzeni a także liczba i masa brodawek. Zaobserwowano, że po zastosowaniu NF udział dużych brodawek o powierzchni $> 10 \text{ mm}^2$ zwiększył się w glebie o optymalnej gęstości, natomiast zmniejszył się w glebie mocno zagęszczonej.

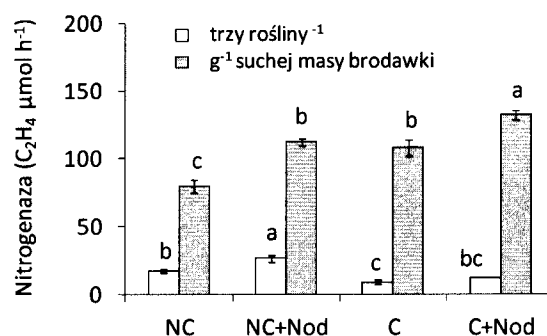
W znaczący sposób czynniki Nod wpłynęły na tempo wiązania azotu w brodawkach poprzez zwiększenie aktywności nitrogenazy, które było statystycznie istotne w glebie o optymalnej gęstości (wzrost o 56%). Specyficzna aktywność nitrogenazy (aktywność w przeliczeniu na 1 g suchej masy brodawki) wzrosła istotnie pod wpływem NF w obu glebach (Rys. 2).

Tabela 4. Średnie wartości parametrów wzrostu roślin. Różne litery dla poszczególnych czynników doświadczalnych (zagęszczenie i czynniki Nod) oznaczają istotne różnice ($p < 0,05$). SRL specyficzna długość korzeni. Na podstawie H1

Parametry	Zagęszczenie gleby*		Czynniki Nod**	
	Nie zagęszczona	Zagęszczona	Brak czynników	Czynniki obecne
Pędy (roślina⁻¹)				
Wysokość (cm)	76,7 a	69,7 b	71,6 b	74,8 a
Masa (g)	4,85 a	3,10 b	3,70 b	4,25 a
Powierzchnia liści (cm ²)	267,1 a	153,7 b	199,3 b	221,5 a
Korzenie (trzy rośliny⁻¹)				
Masa (g)	1,36 a	0,89 b	1,04 b	1,21 a
Długość (m)	173,8 a	67,9 b	112,6 b	129,1 a
SRL (m g ⁻¹)	128,6 a	77,8 b	103,6 a	102,8 a
Średnica (mm)	0,330 b	0,417 a	0,376 a	0,371 a
Brodawki (trzy rośliny⁻¹)				
Liczba	122,1 a	94,8 a	102,0 a	114,9 a
Masa (mg)	223,3 a	86,1 b	148,0 a	161,3 a
Masa (mg brodawka ⁻¹)	2,34 a	0,98 b	1,65 a	1,66 a
Całkowita masa roślin (g trzy rośliny⁻¹)	16,01 a	10,23 b	12,23 b	14,02 a

* obejmuje obiekty z czynnikami Nod i bez czynników Nod

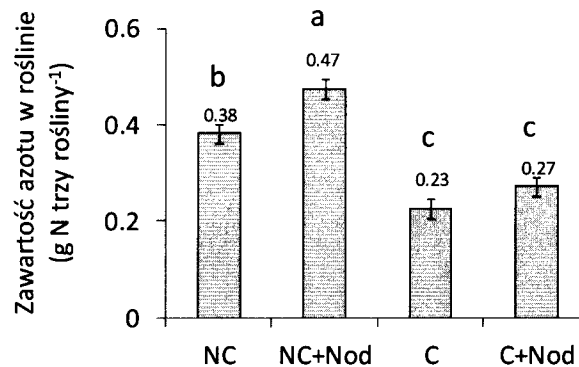
** obejmuje obiekty z glebą nie zagęszczoną i zagęszczoną



Rys. 2. Wpływ stanu zagęszczenia gleby i czynników Nod na aktywność nitrogenazy. Pionowe słupki oznaczają błąd standardowy. Różne litery oznaczają istotne różnice ($p < 0,05$). NC gleba nie zagęszczona, C gleba zagęszczona, Nod czynniki Nod. Na podstawie H1

Całkowita zawartość azotu w roślinach wzrosła pod wpływem NF w glebie o optymalnej gęstości (Rys. 3). Lepszy wzrost roślin traktowanych czynnikami Nod w porównaniu do obiektu kontrolnego korespondował ze zwiększoną zawartością azotu w roślinach. Odnotowano wysoką korelację ($R^2 = 0,881$) pomiędzy aktywnością nitrogenazy a

całkowitą zawartością N w roślinach, jak również między aktywnością nitrogenazy a masą roślin ($R^2=0,796$).



Rys. 3. Wpływ stanu zagęszczenia gleby i czynników Nod na całkowitą zawartość azotu. Pionowe słupki oznaczają błąd standardowy. Różne litery oznaczają istotne różnice ($p<0,05$). NC gleba nie zagęszczona, C gleba zagęszczona, Nod czynniki Nod. Na podstawie H1

Wyniki zamieszczone w pracy **H1** wskazują generalnie na bardziej korzystny wpływ NF na wzrost korzeni niż pędów, co wcześniej obserwowano w pracach przeprowadzonych w warunkach laboratoryjnych w odniesieniu do długości korzeni, powierzchni i suchej masy a także stymulacji tworzenia korzeni bocznych (Maj i in., 2009, Souleimanov i in., 2002).

Podsumowując, osiągnięciem pracy **H1** było wykazanie, że stosowanie czynników Nod znacząco zwiększa aktywność nitrogenazy i całkowitą zawartość azotu roślinnego w glebie o optymalnej gęstości do wzrostu roślin, jak również zwiększa tempo wiązania azotu atmosferycznego w przeliczeniu na 1 g suchej masy brodawki zarówno w glebie o optymalnej gęstości, jak też o wysokiej gęstości, ograniczającej wzrost roślin. Uzyskane wyniki wskazują na to, że zwiększona aktywność symbiotyczna wynikająca z zastosowania NF może łagodzić negatywny wpływ wysokiego stanu zagęszczenia gleby na wzrost grochu, a także poprawiać wzrost grochu i wiązanie azotu w warunkach optymalnej gęstości gleby.

Kontynuacją badań podjętych w pracy **H1** był eksperyment przedstawiony w pracy **H2**, który przeprowadzono w celu określenia reakcji grochu na czynniki Nod w naturalnych warunkach polowych. Badano wpływ czynników Nod na: powierzchnię liści, masę pędów, aktywność nitrogenazy oraz plon nasion i białka.

Warunki pogodowe były odmienne w obu badanych latach, co znacznie wpłynęło na wyniki badań. Ilość opadów w okresie wzrostu grochu (kwiecień-lipiec) wyniosła 168 mm w 2012 r. i 331 mm w 2013 r. Wartości te były odpowiednio o 31% niższe i 36% wyższe od

średniej wieloletniej (243 mm). Średnie temperatury powietrza w tym okresie były zbliżone w latach 2012 i 2013 (15,9 i 15,5°C) i były wyższe od średniej długookresowej (13,7°C).

NF znacznie zmieniły parametry brodawek grochu (Tabela 5). Zastosowanie czynników Nod podwoiło liczbę brodawek w obu latach badań i przyczyniło się do wzrostu ich masy o 67% ($p < 0,05$) i 23% odpowiednio w 2012 i 2013, nie wpływając istotnie na masę pojedynczej brodawki. Wyniki te potwierdziły korzystny wpływ stosowania czynników Nod na parametry brodawek wykazany we wcześniejszych badaniach laboratoryjnych (Kidaj i in., 2012, Souleimanov i in., 2002).

Tabela 5. Parametry brodawek (4,5 dm³ gleby) w latach 2012-2013 w zależności od stosowania czynników Nod. Różne litery oznaczają istotne różnice ($p < 0,05$). Na podstawie H2

Parametry brodawek	2012		2013	
	Kontrola	Czynniki Nod	Kontrola	Czynniki Nod
Brodawki				
Liczba	30,3 b	63,4 a	83,5 b	166,8 a
Masa (mg)	122,4 b	204,5 a	319,3 a	395,4 a
Masa (mg brodawka ⁻¹)	3,70 a	2,98 a	3,14 a	2,27 a
Nitrogenaza (C₂H₄ μmol h⁻¹)				
4,5 dm ³ gleby	11,85 b	29,50 a	12,32 a	18,08 a
brodawka ⁻¹	0,400 a	0,576 a	0,142 a	0,168 a
g ⁻¹ sucha masa brodawki	97,8 b	155,9 a	39,0 b	57,8 a

Wpływ czynników Nod na aktywność nitrogenazy uzależniony był od roku badań. W 2012 r. obserwowano istotny wzrost (o prawie 150%) aktywności w porównaniu z obiektem kontrolnym, natomiast w 2013 r. wpływ był statystycznie nieistotny, pomimo, że aktywność w przeliczeniu na 1 g suchej masy brodawki była istotnie podwyższona po zastosowaniu NF niezależnie od roku badań. Korzystny wpływ NF na wiązanie azotu w stosunkowo suchym sezonie wegetacji w roku 2012 był większy w porównaniu do wyników otrzymanych we wcześniejszym doświadczeniu wazonowym prowadzonym w warunkach optymalnego uwilgotnienia gleby (praca H1). W roku 2012, z względnie suchym okresem kwiecień-czerwiec, notowano mniej brodawek niż w 2013 roku, ale jednocześnie były one większe.

Zastosowanie czynników Nod znacznie zwiększyło masę pędów w latach 2012 i 2013 i powierzchnię liści grochu w 2012 roku (Tabela 6). Plon białka wzrósł o 21% ($p < 0,05$) pod

wpływem NF w stosunkowo suchym roku 2012, natomiast plon nasion wzrósł o 13,7%. W roku 2013 nie wystąpiły istotne zmiany w plonie nasion i białka po zastosowaniu NF.

Tabela 6. Parametry roślin w latach 2012-2013 w zależności od stosowania czynników Nod. Różne litery oznaczają istotne różnice ($p < 0,05$). Na podstawie H2

Parametry	2012		2013	
	Kontrola	Czynniki Nod	Kontrola	Czynniki Nod
Masa pędów (g roślina^{-1})	3,1 b	4,7 a	3,9 b	4,6 a
Powierzchnia liści ($\text{cm}^2 \text{roślina}^{-1}$)	250 b	353 a	378 a	397 a
Plon nasion (g m^{-2})	416,4 b	482,5 a	671,0 a	705,8 a
Plon białka (g m^{-2})	85,8 b	103,7 a	140,2 a	151,8 a

Podsumowując, wyniki otrzymane w pracy **H2** w ramach dwuletniego doświadczenia poletkowego wykazały, że wpływ czynników Nod na brodawkowanie i plonowanie grochu zależy od warunków pogodowych w sezonie wegetacyjnym. Czynniki Nod przyczyniły się do zwiększenia tempa wiązania azotu z powietrza oraz plonu nasion i białka jedynie w sezonie względnie suchym. Sugeruje to, że stosowanie czynników Nod może być korzystne dla wydajności grochu w sezonach o mniejszej niż średnia ilości opadów.

Wpływ szczepionki *Rhizobium* na parametry mikrobiologiczne gleby

Założeniem badań przedstawionych w publikacji **H4** było określenie zmian aktywności enzymatycznej oraz zróżnicowania funkcjonalnego w ryzosferze bobiku zachodzących pod wpływem szczepienia nasion symbiontami *Rhizobium*. Badania prowadzono w warunkach polowych. Szczepionkę *Rhizobium* (Nitragina) pochodzącą z Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach zastosowano na nasiona przed siewem bobiku, w obiekcie kontrolnym nasiona nie były zaszczepiane. Trzykrotnie podczas wegetacji bobiku pobierano glebę ze strefy korzeniowej, aby przeanalizować ją pod kątem aktywności enzymów: dehydrogenaz, ureazy, proteazy oraz fosfomonoesterazy kwaśnej, a także różnorodności funkcjonalnej (CLPP, community level physiological profiles) zbiorowisk bakterii.

W pracy wykazano, że w większości przypadków zastosowanie szczepionki bakteryjnej prowadzi do istotnego wzrostu aktywności enzymów, a intensywność zmian pod

wplywem *Rhizobium* jest różna w poszczególnych fazach rozwoju bobiku (Tabela 7). W fazach 5-6 liści i kwitnienia bobiku różnice pomiędzy obiektami były wyższe dla ureazy (72%-143%) i dehydrogenazy (55%-70%) niż fosfomonoesterazy kwasnej (8%-11%) i proteazy (3%-25%). W fazie zawiązywania strąków najwyższe zmiany po zastosowaniu szczepionki zaobserwowano w przypadku ureazy (102%) i proteazy (86%). Wyniki wskazują na potencjał *Rhizobium* w przemianach N i produkcji trifosforanu adenozyiny poprzez utlenianie materii organicznej w glebie, jak też na rozkład azotu białkowego w procesie hydrolizy a także uwalnianie fosforu nieorganicznego (ortofosforanu) ze związków fosforu organicznego.

Tabela 7. Zmiany aktywności enzymów glebowych oraz wskaźników różnorodności pod wpływem inokulacji *Rhizobium* w czasie wegetacji bobiku. NI obiekt nie inokulowany, I obiekt inokulowany. CLPP community level physiological profiles, AWCD average well colour development, R Richness, H Shannon–Weaver, E Evenness. Różne litery oznaczają istotne różnice ($p < 0,05$). Na podstawie H4

Faza rozwoju	Obiekt	Enzymy				CLPP		
		Dehydrogenazy ($\mu\text{g TPF g}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Proteaza (mg tyrozyny $\text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Ureaza (mg N- $\text{NH}_4 \text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Fosfomonoesteraza kwasna (mmol PNP $\text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	AWCD	R	H
5-6 liści	NI	16,93 e	3,60 ab	0,98 d	41,44 b	1,13 a	30,0 ab	3,376 b
	I	26,24 d	3,69 ab	1,69 c	44,93 a	1,15 a	30,0 ab	3,391 b
Kwitnienie	NI	45,36 c	4,03 a	0,94 d	35,0 d	1,32 a	30,7 ab	3,394 ab
	I	77,13 a	5,03 a	2,28 b	38,9 c	1,25 a	31,0 a	3,392 b
Wykształcanie strąków	NI	45,33 c	1,59 c	1,37 c	39,76 bc	1,17 a	30,3 ab	3,398 ab
	I	62,74 b	2,95 ab	2,77 a	40,65 bc	1,08 a	29,7 b	3,419 a

Stwierdzono, że aktywności enzymów w większości przypadków różniły się istotnie pomiędzy fazami rozwoju, niezależnie od zastosowania szczepionki *Rhizobium*. Maksymalne aktywności dehydrogenazy i proteazy zaobserwowano podczas kwitnienia, a efekt ten był bardziej widoczny po zastosowaniu *Rhizobium*. Wzmoczona aktywność enzymatyczna gleby wynikająca z aplikacji szczepionki bakterii symbiotycznych wskazuje na poprawę warunków wzrostu roślin przez wzbogacenie gleby w składniki odżywcze jak też wzrost odporności na patogeny roślinne (Gopalakrishnan i in., 2015).

Wskaźniki różnorodności funkcjonalnej (AWCD, R, H) nie różniły się istotnie po zastosowaniu szczepionki bakteryjnej. W przypadku H i R odnotowano zmiany w odniesieniu do poszczególnych terminów pomiarowych. Na podstawie wykorzystania substratów węglowych przez mikroorganizmy, wyróżniono 2 grupy obiektów (kryterium Sneath'a 66%).

Największe podobieństwo do siebie pod względem utylizacji substratów węglowych wykazano w terminach 5-6 liści oraz wykształcania strąków dla obiektu, w którym zastosowano szczepionkę. W tej grupie obserwowano niższe niż w pozostałych obiektach wykorzystanie w szczególności: N-acetyl-D-glukozyminy, γ -Laktonu Kwasu D-galaktonowego, L-asparaginy, D-celobiozy, α -D-laktozy, D-kwasu jabłkowego, L-argininy, β -Metylo-D-glukozydu i kwasu itakonowego. Polimery były w mniejszym stopniu utylizowane przez mikroorganizmy po zastosowaniu szczepionki niż w obiekcie kontrolnym w fazie kwitnienia, natomiast kwasy karboksylowe w fazie wykształcania strąków.

Różnorodność funkcjonalna zbiorowisk mikroorganizmów (CLPP) okazała się mniej czułym wskaźnikiem do oceny wpływu szczepienia *Rhizobium* niż aktywność enzymów glebowych. Może to wynikać z faktu, że w tej metodzie mogą być stymulowane do wzrostu rzadkie, nie dominujące, hodowlane mikroorganizmy, które przystosowały się do szybkiego wykorzystania dostępnych substratów. Szacunkowo ok. 1% bakterii obecnych w glebie daje się wyhodować na tradycyjnych podłożach hodowlanych w standardowych warunkach laboratoryjnych. W przeciwieństwie do CLPP, aktywność enzymatyczna gleby nie opiera się na hodowli drobnoustrojów. Warto zauważyć, że szczepionka wywołała zmiany aktywności enzymów glebowych podczas całego okresu wegetacji w przeciwieństwie do różnorodności funkcjonalnej.

Podsumowując, badania przedstawione w pracy H4 pokazały, że inokulacja szczepionką bakterii symbiotycznych *Rhizobium* nasion bobiku wiąże się z nasileniem aktywności enzymatycznej w ciągu okresu wegetacji, a skala tych zmian uzależniona jest od rodzaju enzymu i fazy rozwoju rośliny.

PODSUMOWANIE

Określenie reakcji roślin bobowatych i wybranych własności mikrobiologicznych gleby w strefie korzeniowej na zastosowanie flawonoidów, czynników Nod i szczepionki *Rhizobium* stanowi przedmiot badań wskazanych jako osiągnięcie naukowe. Badania te mają zarówno charakter podstawowy, jak i aplikacyjny. Ich wyniki znajdują zastosowanie w opracowaniu sposobów regulacji procesów biologicznych i struktury mikroorganizmów w strefie korzeniowej roślin decydujących o jakości i żyzności gleby. Z drugiej strony otrzymane wyniki mogą posłużyć do opracowania sposobów zwiększenia plonów roślin bobowatych, a co bardziej istotne, zwiększenia udziału azotu pochodzącego z atmosfery w

plonie roślin, za czym przemawiają efekty ekonomiczne i ekologiczne. Do najbardziej istotnych wyników osiągnięcia należy zaliczyć:

1. określenie zmian aktywności enzymów oraz populacji i różnorodności funkcjonalnej mikroorganizmów w ryzosferze grochu pod wpływem flawonoidów i czynników Nod podczas sezonu wegetacji
2. wykazanie, że flawonoidy i czynniki Nod zwiększają aktywność wybranych enzymów glebowych oraz liczebność mikroorganizmów, które korzystnie wpływają na jakość gleby i roślin
3. wykazanie, że zastosowanie czynników Nod prowadzi do zwiększenia tempa wiązania azotu z powietrza, plonu nasion i białka w sezonie wegetacji o mniejszej niż średnia ilości opadów
4. określenie oddziaływania czynników Nod na wzrost roślin i symbiotyczne wiązanie azotu w glebie o wysokiej gęstości
5. wykazanie, że inokulacja nasion szczepionką *Rhizobium* pociąga za sobą wzmożoną aktywność enzymów glebowych podczas okresu wegetacji.

Literatura

1. Almaraz J.J., Zhou X., Souleimanov A., Smith, D. 2007. Gas exchange characteristics and dry matter accumulation of soybean treated with Nod factors. *J. Plant Physiol.* 164, 1391–1393
2. 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. *Irrig. Drain.* 54, 15–30
3. Antunes P.M., Rajcan I., Goss M.J. 2006. Specific flavonoids as interconnecting signals in the tripartite symbiosis formed by arbuscular mycorrhizal fungi, *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan and soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Soil Biol. Biochem.* 38(3), 533–543
4. Bardin S.D., Huang H.C., Pinto J., Amundsen E.J., Erickson R.S. 2004. Biological control of *Pythium* damping-off of pea and sugar beet by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*. *Can. J. Bot.* 82, 291–296
5. Begum A.A., Leibovitch S., Migner P., Zhang F. 2001. Specific flavonoids induced nod gene expression and pre-activated nod genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *J. Exp. Bot.* 52, 1537–1543
6. Botta G.F., Tolon-Becerra A., Lastra-Bravo X., Tourn M., 2010. Tillage and traffic effects (planters and tractors) on soil compaction and soybean (*Glycine max* L.) yields in Argentinean pampas. *Soil Till. Res.* 110, 167–174.
7. BATTERY B.R., TAN C.S., DRURY C.F., PARK S.J., ARMSTRONG R.J., PARK K.Y. 1998. The effects of soil compaction, soil moisture and type on growth and nodulation of soybean and common bean. *Can. J. Plant Sci.* 78, 571–576.

8. Carranca C., de Varennes A., Rolston D. 1999. Biological nitrogen fixation by fababean, pea and chickpea, under field conditions, estimated by the ^{15}N isotope dilution technique. *European Journal of Agronomy* 10, 49–56
9. Cesco S., Mimmo T., Tonon G., Tomasi N., Pinton R., Terzano R., Neumann G., Weisskopf L., Renella G., Landi L., Nannipieri P. 2012. Plant-borne flavonoids released into the rhizosphere: impact on soil bio-activities related to plant nutrition. A review. *Biol. Fert. Soils* 48, 123–149
10. Cooper J.E. 2004. Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. *Adv. Bot. Res.* 41, 1–62
11. Dakora F.D. 2003. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. *New Phytol.* 158, 39–49
12. Dakora F.D., Phillips D.A. 1996. Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49, 1–20
13. Dardanelli M.S., Manyani H., González-Barroso S., Rodríguez-Carvajal M.A., Gil-Serrano A.M., Espuny M.R., Javier López-Baena F., Bellogín R.A., Megías M., Ollero F.J. 2010. Effect of the presence of the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) *Chryseobacterium balustinum* Aur9 and salt stress in the pattern of flavonoids exuded by soybean roots. *Plant Soil* 328, 483–493
14. D’Haeze W., Holsters M. 2002. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* 12, 79–105
15. Dolatabadian A., Sanavy S.A.M.M., Ghanati F., Gresshoff P.M. 2012. Morphological and physiological response of soybean treated with the microsymbiont *Bradyrhizobium japonicum* pre-incubated with genistein. *South African Journal of Botany* 79, 9–18
16. Duzan H.M., Mabood F., Zhou X., Souleimanov A., Smith D.L. 2005. Nod factors induces soybean resistance to powdery mildew. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 1022–1030
17. Duzan H.M., Zhou X., Souleimanov A., Smith D.L. 2004. Perception of *Bradyrhizobium japonicum* Nod factor by soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] root hairs under abiotic stress conditions. *J. Exp. Bot.* 55, 2641–2646
18. Dyachok J.V., Tobin A.E., Price N.P.J., von Arnold S. 2000. Rhizobial Nod factors stimulate somatic embryo development in *Picea abies*. *Plant Cell Reports.* 19, 290–297
19. Farfour S.A., Al-Saman M.A. 2014. Root-rot and Stem-canker Control in Faba Bean Plants by Using Some Biofertilizers Agents. *J. Plant Pathol. Microb.* 5, 218. doi:10.4172/2157-7471.1000218
20. Fokom R., Nana Wakam L., Tchameni S., Nwaga D. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) colonisation and rhizobia nodulation of cowpea as affected by flavonoid application. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 6, 1015–1021
21. Gopalakrishnan S., Sathya A., Vijayabharathi R., Varshney R.K., Gowda C.L.L., Krishnamurthy L. 2015. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech.* 5, 355–377
22. Gregorich E.G., Lapen D.R., Ma B.L., McLaughlin N.B., VandenBygaart A.J. 2011. Soil and crop response to varying levels of compaction, nitrogen fertilization, and clay content. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 75, 1483–1492

23. Guo Z.Y., Kong C.H., Wang J.G., Wang Y.F. 2011. Rhizosphere isoflavones (daidzein and genistein) levels and their relation to the microbial community structure of mono-cropped soybean soil in field and controlled conditions. *Soil Biol. Biochem.* 43, 2257–2264
24. Hassan S., Mathesius U. 2012. The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions. *J. Exp. Bot.* 2, 1-6
25. Herridge D.F., Peoples M.B., Boddey R.M. 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* 311, 1–18
26. Huang H.C., Erickson R.S. 2007. Effect of seed treatment with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* on *Pythium* damping-off, seedling height, root nodulation, root biomass, shoot biomass, and seed yield of pea and lentil. *J. Phytopathol.* 155, 31–37.
27. Jain V., Gupta K. 2003. The flavonoid naringenin enhances intercellular colonization of rice roots by *Azorhizobium caulinodans*. *Biol. Fertil. Soils* 38, 119–123
28. Jensen E.S., Peoples M.B., Hauggaard-Nielsen H. 2010. Faba bean in cropping systems. *Field Crops Research* 115, 203–216
29. Khan W., Prithiviraj B., Smith D.L. 2008. Nod factor [Nod Bj V (C18:1, MeFuc)] and lumichrome enhance photosynthesis and growth of corn and soybean. *J. Plant Physiol.* 165, 1342–1351
30. Kidaj D., Wielbo J., Skorupska A. 2012. Nod factors stimulate seed germination and promote growth and nodulation of pea and vetch under competitive conditions. *Microbiol. Res.* 167, 144–150
31. Kopke U., Nemecek T. 2010. Ecological services of faba bean. *Field Crops Research* 115, 217–233
32. Korir H., Mungai N.W., Thuita M., Hamba Y., Masso C. 2017. Co-inoculation effect of rhizobia and plant growth promoting rhizobacteria on common bean growth in a low phosphorus soil. *Front. Plant Sci.* 8, 141. doi: 10.3389/fpls.2017.00141
33. Lira Jr. M. de A., Lima A.S.T., Arruda J.R.F., Smith D.L. 2005. Effect of root temperature on nodule development of bean, lentil and pea. *Soil Biol. Biochem.* 37, 235-239
34. Maj D., Wielbo J., Marek-Kozaczek M., Martyniuk S., Skorupska A. 2009. Pretreatment of clover seeds with Nod factors improve growth and nodulation of *Trifolium pretense*. *J. Chem. Ecol.* 35, 479–487
35. Maj D., Wielbo J., Marek-Kozaczuk M., Skorupska A. 2010. Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiol. Res.* 165, 50–60
36. Mastrodomenico A.T., Purcell L.C., King C.A. 2013. The response and recovery of nitrogen fixation activity in soybean to water deficit at different reproductive developmental stages. *Environmental and Experimental Botany* 85, 16–21
37. McKay I.A., Djordjevic M.A. 1993. Production and excretion of nod metabolites by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* are disrupted by the same environmental factors that reduce nodulation in the field. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3385–3392
38. Miransari M., Smith D. 2009. Rhizobial lipo-chitooligosaccharides and gibberellins enhance barley (*Hordeum vulgare* L.) seed germination. *Biotechnology*, 8, 270–275
39. Nosalewicz A., Lipiec J. 2014. The effect of compacted soil layers on vertical root distribution and water uptake by wheat. *Plant Soil* 375, 229–240

40. Pengthamkeerati P., Motavalli P.P., Kremer R.J. 2011. Soil microbial activity and functional diversity changed by compaction, poultry litter and cropping in a claypan soil. *Appl. Soil Ecol.* 48, 71–80
41. Prithiviraj B., Zhou X., Souleimanov A., Kahn 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
42. Raaijmakers J.M., Paulitz T.C., Steinberg C., Alabouvette C., Moëgne-Loccoz Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321, 341–361
43. Sánchez A.C., Gutiérrez R.T., Santana R.C., Urrutia A.R., Fauvart M., Michiels J., Vanderleyden J. 2014. Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. *European Journal of Soil Biology* 62, 105-112
44. Sang M.K., Kim K.D. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria suppressive to *Phytophthora* blight affect microbial activities and communities in the rhizosphere of pepper (*Capsicum annuum* L.) in the field. *Appl. Soil Ecol.* 62, 88–97
45. Schmidt P.E., Broughton W.J., Dietrich W. 1994. Nod factors of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium* sp. NGR234 induce flavonoid accumulation in soybean root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7(3), 384-390
46. Schulten H.R., Schnitzer M. 1998. The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biol. Fert. Soils* 26, 1–15
47. Siczek A., Fraç M. 2012. Soil microbial activity as influenced by compaction and straw mulching. *Int. Agrophys.* 26, 65–69
48. Siczek A., Lipiec J., 2011. Soybean nodulation and nitrogen fixation in response to soil compaction and surface straw mulching. *Soil and Tillage Research* 114, 50-56
49. Souleimanov A., Prithiviraj B., Smith D.L. 2002. The major Nod factor of *Bradyrhizobium japonicum* promotes early growth of soybean and corn. *J. Exp. Bot.* 53, 1929–1934
50. Stagnari F., Maggio A., Galieni A. Pisante A.M. 2017. Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 4(2), DOI 10.1186/s40538-016-0085-1
51. Trabelsi D., Ammar H.B., Mengoni A., Mhamdi R. 2012. Appraisal of the crop-rotation effect of rhizobial inoculation on potato cropping systems in relation to soil bacterial communities. *Soil Biol. Biochem.* 54, 1–6
52. Trabelsi D., Mengoni A., Ammar H.B., Mhamdi R. 2011. Effect of on-field inoculation of *Phaseolus vulgaris* with rhizobia on soil bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 77, 211–222
53. Unkovich M.J., Pate J.S. 2000. An appraisal of recent yield measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. *Field Crops Research* 65, 211-228
54. Unkovich M.J., Sanford P., Pate J.S. 1996. Nodulation and nitrogen fixation by subterranean clover in acid soils as influenced by lime application, toxic aluminium, soil mineral N, and competition from annual ryegrass. *Soil Biol. Biochem.* 28, 639-684

55. von Richthofen J.S. 2006. Agro-economic benefits of grain legumes in cropping system, in: Benefits of grain legumes for European agriculture and environment: new results and prospects. GL-Pro Dissemination Event, Brussels: 17-26
56. Wang J., Li X., Zhang J., Yao T., Wei D., Wang Y., Wang J. 2012. Effect of root exudates on beneficial microorganisms—evidence from a continuous soybean monoculture. *Plant Ecol.* 213(12), 1883–1892
57. Xie Z-P., Müller J., Wiemken A., Broughton W.J., Boller T. 1997. Nod factors and triiodobenzoic acid stimulate mycorrhizal colonization and affect carbohydrate partitioning in mycorrhizal roots of *Lablab purpureus*. *New Phytol.* 139, 361–366
58. Yadav J., Verma J.P. 2014. Effect of seed inoculation with indigenous *Rhizobium* and plant growth promoting rhizobacteria on nutrients uptake and yields of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Eur. J. Soil Biol.* 63, 70–77
59. Zahir Z.A., Zafar-ul-Hye M., Sajjad S., Naveed M. 2011. Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC-deaminase for coinoculation with *Rhizobium leguminosarum* to improve growth, nodulation, and yield of lentil. *Biol. Fert. Soils* 47,457–465
60. Zhang N., He X., Gao Y., Li Y., Wang H., Ma D., Zhang R., Yang S. 2010. Pedogenic carbonate and soil dehydrogenase activity in response to soil organic matter in *Artemisia ordosica* community. *Pedosphere* 20, 229–235

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

A. Przed uzyskaniem stopnia doktora

W roku 2004 zostałam słuchaczem Studiów Doktoranckich w Instytucie Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie. Włączyłam się w działalność Zakładu Podstaw Kształtowania Środowiska Glebowego, obecnie Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina, kierowanego przez prof. dr hab. Jerzego Lipca. Początkowo brałam udział w pracach realizowanych w ramach projektu badawczego kierowanego przez prof. dr hab. Jerzego Lipca pt. „Wpływ makroporów glebowych na wzrost korzeni i pędów roślin oraz wymywanie składników pokarmowych z gleby”. Wynikiem jest współautorstwo w dwóch publikacjach naukowych w czasopiśmie z bazy *Journal Citation Reports (JCR)* (Załącznik II.A.11,12) i opracowań w książkach (Załącznik II.D.5, Załącznik I.D.8). Oprócz tego, wyniki prowadzonych badań były przedstawione na kilku konferencjach krajowych i międzynarodowych (Załącznik I.A.1-6,9,18,20). Tematyka tych prac obejmowała analizę wymywania herbicydu atrazyny i składników pokarmowych: Mg, K, Mn i Fe z gleb o różnym sposobie użytkowania tj. uprawa tradycyjna i 35 letni sad owocowy.

W latach 2008-2009 byłam wykonawcą projektu promotorskiego pt.: „Wpływ gęstości gleby i ściółkowania na wzrost systemu korzeniowego i części nadziemnych soi”, którego wyniki przedstawiłam w rozprawie doktorskiej przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. J. Lipca pod takim samym tytułem. Rozprawa doktorska została wyróżniona przez Radę Naukową Instytutu Agrofizyki PAN, a wyniki osiągnięte w toku realizacji projektu były prezentowane na licznych konferencjach zarówno krajowych, jak i międzynarodowych (Załącznik 5 I.A.8,10-12,14-17,19,21,22). Ponadto efekty podjętych badań zostały zaprezentowane w opublikowanych sprawozdaniach (Załącznik 4 II.D.2-4) i w folderach informacyjnych o Instytucie Agrofizyki PAN (Załącznik 5 I.D.4,5).

W czasie Studiów Doktoranckich byłam stypendystką Projektu Stypendialnego „Stypendia dla młodych naukowców szansą agrorozwoju Lubelszczyzny” finansowanego z Europejskich Funduszy Strukturalnych i Zintegrowanego Programu Operacyjnego Rozwoju Regionalnego, w okresie od 2005 do 2007 roku. Otrzymane stypendium umożliwiło mi przygotowanie dwóch prac naukowych, które ukazały się w książkach (Załącznik 5 I.D.6,7). W 2008 roku zostałam beneficjentem projektu systemowego „Stypendia naukowe dla doktorantów” finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, Budżetu Państwa oraz Budżetu Województwa.

Przed obroną pracy doktorskiej opublikowałam łącznie cztery prace recenzowane, z czego dwie w czasopiśmie indeksowanym na liście *JCR*. Brałam udział w konferencjach krajowych i międzynarodowych, gdzie prezentowałam zarówno referaty, jak i brałam udział w sesjach posterowych (łącznie ukazały się 23 doniesienia konferencyjne). Dodatkowo aktywnie uczestniczyłam w organizacji warsztatów "Agrofizyczne metody badawcze" (udział w Komitecie organizacyjnym).

B. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk rolniczych

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk rolniczych w zakresie agronomii-agrofizyki zostałam zatrudniona początkowo na stanowisku biotechnologa, a niedługo potem awansowałam na stanowisko adiunkta w Instytucie Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie w Zakładzie Badań Systemu Gleba-Roślina, kierowanego wówczas przez prof. dr hab. Jerzego Lipca, a obecnie przez prof. dr hab. Magdalenę Frąc. Początkowo po uzyskaniu stopnia doktora skupiłam się na opublikowaniu wyników zamieszczonych w mojej rozprawie doktorskiej. Wyniki zamieszczone w rozprawie doktorskiej ukazały się w trzech publikacjach w czasopiśmie znajdującym się w bazie *JCR*.

Sumaryczny Impact factor tych prac to 6,987, a liczba punktów według MNiSW wynosi 92. Tematyka wspomnianych prac ukierunkowana jest na:

1. ocenę wpływu różnych stanów zagęszczenia gleby (niski, średni i wysoki) oraz ściółkowania gleby słomą pszenną na jej aktywność mikrobiologiczną (aktywność enzymów glebowych oraz liczebność drobnoustrojów) (Załącznik 4 II.A.8). Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że zarówno zagęszczenie gleby jak i ściółka istotnie wpłynęły na badane parametry. Wykazano, że analizowane parametry osiągnęły najwyższe wartości w glebie o średnim stanie zagęszczenia, zaś najniższe w glebie najbardziej zagęszczonej, przy czym ściółka zwiększyła aktywności enzymów i liczebności mikroorganizmów we wszystkich stanach zagęszczenia gleby.
2. określenie wpływu zróżnicowanych stanów zagęszczenia gleby (niski, średni i wysoki) i jej ściółkowania na wiązanie azotu atmosferycznego (aktywność nitrogenazy, brodawkowanie) i plon soi (Załącznik 4 II.A.9). W wyniku badań wykazano, że ściółka wpłynęła na wiązanie azotu oraz brodawkowanie w większym stopniu niż stan zagęszczenia gleby, natomiast odwrotną zależność wykazano w odniesieniu do plonu białka i nasion. Ściółka istotnie wpłynęła na tempo wiązania azotu przez zwiększenie aktywności nitrogenazy i średnicy brodawek oraz na plon nasion. Ponadto, ściółkowanie oraz wysoki stan zagęszczenia gleby zwiększyły udział dużych brodawek oraz suchą masę jednej brodawki. Najwyższy plon nasion i białka uzyskano z obiektu z glebą ściółkowaną średnio zagęszczoną, natomiast najniższy w glebie najbardziej zagęszczonej. Wyniki uzasadniają rekomendację ściółkowania słomą gleby w celu poprawy wydajności uprawy soi, zwłaszcza w przypadku gleb o niskim i średnim stanie zagęszczenia.
3. określenie zależności między gęstością gleby i ściółką a własnościami fizycznymi gleby (temperatura, potencjał macierzysty, opór penetracji) i plonowaniem soi (Załącznik 4 II.A.5) w trzech latach o różnych warunkach atmosferycznych. Najważniejsze efekty tej pracy to wykazanie, że ściółkowanie spowodowało wzrost plonu białka i tłuszczu w latach z równomiernymi opadami deszczu. Natomiast w roku o stosunkowo małej ilości opadów ściółkowanie negatywnie wpłynęło na wzrost soi ze względu na zatrzymywanie wody opadowej przez ściółkę i wzrost oporu mechanicznego zwłaszcza w glebie najbardziej zagęszczonej.

Dodatkowo wyniki badań uzyskane w ramach pracy doktorskiej prezentowałam na konferencjach (Załącznik 5 I.A.24-27).

W tym czasie ukazały się również dwie publikacje (Załącznik II.A.6,10) oraz rozdział w książce w języku angielskim (Załącznik II.C.1) na temat wymywania herbicydu atrazyny, składników pokarmowych: $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$ i $\text{PO}_4\text{-P}$ oraz Mg, K, Mn i Fe z gleb o różnym sposobie użytkowania tj. uprawa tradycyjna i gleba z 35 letniego sadu owocowego. Ponadto jestem współautorem opublikowanego sprawozdania na temat wpływu sposobu użytkowania gleby na jej aktywność mikrobiologiczną (Załącznik II.D1). Brałam też udział w realizacji projektu kierowanego przez prof. dr hab. J. Lipca pt.: „Modelowanie europejskiego rolnictwa ze zmianami klimatu dla bezpieczeństwa żywności”.

Moje zainteresowania naukowe nadal skupiały się na ocenie wpływu wysokiego stanu zagęszczenia gleby na wzrost roślin. Badania te realizowałam w ramach zadań działalności statutowej Instytutu Agrofizyki PAN kierowanych przez prof. dr hab. Jerzego Lipca. W efekcie, przy współpracy z prof. Rainerem Hornem z Institute for Plant Nutrition and Soil Science w Kiel (Niemcy), dr Jackiem Pietrusiewiczem z UMCS w Lublinie oraz pracownikami Instytutu Agrofizyki PAN ukazały się trzy publikacje znajdujące się w bazie *JCR* (sumaryczny IF to 9,804, 115 pkt. MNiSW). Prace te poruszają następujące zagadnienia:

1. określenie zmian własności fizykochemicznych korzeni wybranych roślin zbożowych powodowanych przez wysoką gęstość gleby (Załącznik II.A.1). Najistotniejszy rezultat tych badań to wykazanie, że nadmierne zagęszczenie gleby powoduje niekorzystne zamiany parametrów charakteryzujących pobieranie i wiązanie kationów w korzeniach tj. zmniejszenie: całkowitej pojemności wymiany kationów, całkowitego ładunku powierzchniowego i gęstości ładunku powierzchniowego oraz zwiększenie pozornej powierzchni właściwej korzeni. Wiąże się to z niedoborem składników pokarmowych do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin. Zależności takie odnotowano dla wszystkich badanych gatunków roślin: pszenicy, pszenżyta, żyta, jęczmienia i kukurydzy, choć w różnym natężeniu.
2. określenie wpływu kształtu ziaren piasku na wzrost pszenicy (Załącznik II.A.4). W pracy wykazano istotny związek pomiędzy kształtem ziaren piasku (okrągły i szorstki, pochodzący ze złóż odpowiednio fluwioglacjalnych i eolicznych) a wzrostem siewek pszenicy (ocenionym na podstawie długości, masy i średnicy korzeni, masy i powierzchni pędów) oraz właściwościami fizycznymi piasku (gęstość, przepuszczalność wodna). Obniżenie wartości analizowanych parametrów roślinnych (z wyjątkiem średnicy korzeni, która uległa zwiększeniu) powodowane przez piasek o chropowatym kształcie powiązane było z utrudnionym przemieszczaniem ziaren piasku. Jest to o tyle istotny problem, że

wiele gleb uprawnych to gleby piaszczyste, a ponadto w licznych badaniach wazonowych piasek stosowany jest jako podłoże do wzrostu roślin. Wykorzystanie różnego rodzaju piasku w badaniach, gdzie istotna jest ocena tempa wzrostu roślin, może prowadzić do błędnych wyników

3. ocena wpływu wysokiego stanu zagęszczenia gleby na początkowy wzrost wybranych roślin zbożowych (Załącznik 4 II.A.7). Najważniejszym osiągnięciem pracy był opis zmian w budowie korzeni (zmiana kształtu, powierzchni przekroju), łącznie ze zmianami anatomicznymi korzeni (deformacje komórek kory oraz walca osiowego, ich powierzchni) powodowanych przez wysoką gęstość gleby, oraz wykazanie, że intensywność zmian pod wpływem nadmiernego zagęszczenia gleby była zróżnicowana u różnych gatunków roślin (pszenica, pszenżyto, żyto, jęczmień i kukurydza). Warto podkreślić, że pracę tą dotychczas cytowano aż 39 razy (wg Web of Science).

Drugi kierunek moich zainteresowań naukowych dotyczy symbiotycznego wiązania azotu atmosferycznego przez rośliny bobowate, a zwłaszcza poszukiwania metod zwiększających potencjał tego procesu, jak również czynników regulujących proces symbiotycznego oddziaływania roślin bobowatych z rizobiami. Dodatkowo moje zainteresowania ukierunkowane są na analizę przemian azotu związanego symbiotycznie i jego pobieranie przez rośliny następcze, jak również na mikrobiologię i biochemię środowiska glebowego. Prace nad tymi zagadnieniami realizowałam i nadal realizuję w ramach trzech projektów badawczych, finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Narodowe Centrum Nauki, których jestem kierownikiem. W realizację tych projektów zaangażowani byli pracownicy Zakładu Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie oraz Zakładu Gleboznawstwa i Chemii Rolniczej Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach.

W projekcie własnym już zakończonym pt. „Wpływ flawonoidów, czynników Nod oraz ściółkowania na brodawkowanie i plonowanie grochu”, badania skupione były na określeniu wpływu stosowania flawonoidów i czynników Nod oraz ściółkowania słomą gleby na brodawkowanie, wiązanie azotu, wzrost części nadziemnych i korzeni oraz plonowanie grochu, a także wybrane właściwości gleby. W efekcie jego realizacji opublikowano trzy prace naukowe (H2,3,5) w czasopiśmie indeksowanym w *JCR* o sumarycznym IF 5,426, 80 pkt. MNiSW. Wszystkie te prace wchodziły w skład osiągnięcia naukowego. Ponadto rezultaty badań zostały przedstawione na konferencjach (Załącznik 5 I.A.28,34,36,41).

Głównym celem następnego projektu badawczego pt. „Określenie wpływu czynników Nod na proces biologicznej redukcji azotu cząsteczkowego przez bobik” realizowanego pod moim kierownictwem jest poznanie i wyjaśnienie zjawiska infekcji korzeni bobiku przez bakterie symbiotyczne *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* w obecności czynników Nod poprzez:

- określenie aktywności symbiotycznej, w tym pomiar ilości biologicznie zredukowanego azotu
- charakterystykę szczepów rizobiów zasiedlających brodawki bobiku
- określenie reakcji części nadziemnych, korzeni i plonowania bobiku
- ocenę aktywności enzymatycznej i mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę bobiku.

Na podstawie wyników badań dotychczas opublikowano jedną pracę naukową (H4), która składa się na osiągnięcie naukowe. Kolejna publikacja jest w recenzji do czasopisma z bazy *JCR*. Wyniki prezentowane były również na kilku konferencjach (Zał.5 I.A.46-50,54).

Kolejny projekt, którego jestem kierownikiem nosi tytuł „Biochemiczne przemiany w glebie związków organicznych azotu zsyntetyzowanych w procesie biologicznej redukcji azotu przez bobik i jego pobieranie przez rośliny następcze” i jest realizowany od marca 2017 roku. Założeniem tego projektu jest szczegółowa analiza przemian organicznych związków azotu (powstałych w roślinach bobiku podczas procesu biologicznej redukcji azotu) w glebie oraz określenie ilości azotu pobieranego przez rośliny następcze, jak również sprawdzenie inhibicyjnych właściwości pentachlorofenolu w procesie biologicznej redukcji azotu w warunkach doświadczenia polowego. Zaplanowane badania zapełniają lukę w literaturze, bowiem biochemiczne przemiany (w czasie wzrostu i rozwoju roślin następczych) organicznych związków azotu i węgla występujących w resztkach poźniwnych roślin bobowatych wprowadzonych do gleby nie zostały dotąd szczegółowo opisane w literaturze. Dotyczy to zwłaszcza różnych związków azotu (aminokwasy, amidy, aminocukry) oraz frakcji azotu łatwo, trudno i niehydrolizujących, jak również związków węgla (kwasy fulwowe i huminowe). Co więcej, badania uzupełnią wiedzę na temat procesu rozkładu resztek poźniwnych roślin bobowatych i zbożowych (różniących się znacznie pod względem stosunku C:N), który będzie analizowany na podstawie aktywności enzymów zaangażowanych w obieg C, N i P, różnorodności funkcjonalnej i genetycznej mikroorganizmów, jak też na podstawie składu gatunkowego bakterii i grzybów (analiza metagenomiczna). Dodatkowo otrzymane wyniki znajdą zastosowanie w sporządzeniu bilansu azotu, jak również w oszacowaniu ilości stosowanych nawozów azotowych w

produkcji rolniczej, co istotnie wpływa na ekonomię nawożenia roślin oraz ochronę środowiska. Wyniki uzyskane w ramach tego projektu zaprezentowałam na konferencji międzynarodowej (Załącznik 5 I.A.55).

W 2011 roku zostałam stypendystką Stypendium Dyrektora Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie. Umożliwiło mi to przeprowadzenie badań na temat oddziaływania czynników Nod na symbiotyczne wiązanie azotu oraz wzrost grochu w warunkach zróżnicowanej gęstości gleby. W efekcie tego stypendium ukazała się publikacja, która jest włączona do osiągnięcia (praca H1).

Moja praca naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora ponadto dotyczyła kwestii zagospodarowania odpadów przemysłu rolno-spożywczego. Badania te realizowałam jako wykonawca w ramach dwóch projektów badawczych kierowanych przez prof. dr hab. Magdalenę Frąć: projektu własnego „Różnorodność populacji mikroorganizmów i aktywność biochemiczna strefy korzeniowej wybranych roślin uprawnych w wyniku rolniczego zagospodarowania osadów z oczyszczalni ścieków mleczarskich”, oraz projektu Lider „Opracowanie innowacyjnego biopreparatu do optymalizacji procesu fermentacji metanowej odpadów organicznych”. Moim zadaniem we wspomnianych projektach był udział w analizach mikrobiologicznych i biochemicznych substratów, masy fermentacyjnej, osadu i gleby, jak również dobór szczepów grzybów w celu uzyskania biopreparatu. Rezultaty tych badań zostały opublikowane w 2 pracach naukowych z listy JCR (Załącznik 4 II.A.2,3) oraz w Raporcie Polskiej Akademii Nauk (Załącznik 4 II.C.2), jak też były zaprezentowane na wielu konferencjach (Załącznik 5 I.A.29-33,35,37-40,42-44,51-53,56). Ponadto jestem współautorem patentu przyznanego przez Urząd Patentowy RP pt. „Nowy szczep grzyba *Trichoderma atroviride* G79/11, sposób otrzymywania biopreparatu do fermentacji metanowej odpadów organicznych z wykorzystaniem tego szczepu oraz sposób prowadzenia fermentacji metanowej odpadów organicznych z zastosowaniem biopreparatu”, który powstał w efekcie realizacji projektu Lider.

Od roku 2018 będę uczestniczyła w charakterze wykonawcy w projekcie realizowanym w ramach Programu „Środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo” – BIOSTRATEG pt.: „Nowe rozwiązania biotechnologiczne w diagnostyce, zwalczaniu i monitoringu kluczowych patogenów grzybowych w ekologicznej uprawie owoców miękkich” finansowanym przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, pod kierownictwem prof. dr hab. Magdaleny Frąć. Celem nadrzędnym tego projektu jest opracowanie nowych rozwiązań w

diagnostyce, zwalczaniu i monitorowaniu najważniejszych patogenów grzybowych w ekologicznej uprawie owoców.

W mojej działalności dydaktycznej i popularyzującej naukę w latach 2010-2017, prowadziłam wykłady dla studentów Studiów Doktoranckich w Instytucie Agrofizyki PAN oraz brałam udział w Lubelskim Festiwalu Nauki. Ponadto wygłosiłam referat w ramach Dni informacyjnych o projektach realizowanych w Instytucie Agrofizyki PAN. Pełniłam funkcję promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim. Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Agrofizycznego (od 2009 roku). Ponadto wykonałam recenzje 7 artykułów naukowych do czasopism takich jak: PLOS ONE, Crop & Pasture Science, International Agrophysics, Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych. Jestem współautorem łącznie 56 doniesień konferencyjnych, w tym 33 po uzyskaniu stopnia doktora. Swoje umiejętności i zainteresowania naukowe poszerzałam uczestnicząc w kursach i szkoleniach.

W 2017 roku m. in. za publikację, której jestem współautorem (Załącznik II.A.3) została przyznana nagroda zespołowa Rektora Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Do chwili obecnej ukazały się łącznie 22 recenzowane prace naukowe, których jestem współautorem, w tym 17 w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Report*, których sumaryczny *Impact Factor* wynosi **35,615**, a liczba punktów MNiSW **513**. Po uzyskaniu stopnia doktora opublikowano łącznie 12 recenzowanych prac naukowych (które nie wliczają się do osiągnięcia naukowego) mojego współautorstwa, w tym 10 w czasopismach indeksowanych w *JCR*, których sumaryczny *Impact Factor* wynosi 21,296, a liczba punktów MNiSW 330. Liczba cytowań moich prac wg Web of Science wynosi 95 (bez autocytań), natomiast indeks Hirscha wynosi 6. Dotychczas byłam kierownikiem 3 projektów badawczych, a w roli wykonawcy uczestniczyłam lub będę uczestniczyć w realizacji łącznie 6 projektów badawczych.

Zestawienie dorobku naukowego

Dorobek naukowy	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Razem
Oryginalne prace twórcze w czasopismach z IF, w tym	2	15	17
- prace stanowiące osiągnięcie naukowe	0	5	5
- pozostałe prace	2	10	12
Pozostałe oryginalne prace twórcze bez IF	3	2	5
Sumaryczny IF	3,461	32,154	35,615
Punkty MNiSW za publikacje	38	475	513
Projekty badawcze finansowane ze źródeł zewnętrznych, kierownictwo	0	3	3
Projekty badawcze finansowane ze źródeł zewnętrznych, wykonawstwo	2	4	6
Komunikaty w materiałach konferencyjnych	23	33	56
Recenzje publikacji	0	7	7
Patenty	0	1	1

Anna Siczek