



Uniwersytet Rolniczy im. *Hugona Kollątaja* w Krakowie
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny

Anna Szczerba

Nr albumu: 980

**Fizjologiczne, mikrobiologiczne i molekularne
aspekty plonowania soi (*Glycine max* L.)**

Rozprawa doktorska wykonana
w Katedrze Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa
pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. inż. Agnieszki Płazek
i promotora pomocniczego dr inż. Magdaleny Wójcik-Jagła

Kraków, grudzień 2022

Podziękowania

Na powstanie i ostateczny kształt mojej pracy doktorskiej miało wpływ wiele osób, którym chciałbym w tym miejscu podziękować.

Przede wszystkim dziękuję Pani Promotor prof. dr hab. inż. Agnieszce Płażek, bez pomocy której ta praca nigdy by nie powstała. Za całą przekazaną mi przez te lata wiedzę oraz wszelką pomoc. Składają się na nią między innymi: niezliczone godziny konsultacji, setki poprawionych ołówkiem stron kolejnych wersji tej pracy oraz wiele minut rozmów telefonicznych. Za życzliwość, wsparcie i zaufanie, którym mnie obdarzyła od samego początku pojawienia się w Jej pokoju, będę zawsze wdzięczna i pamiętać. Miałam w życiu ogromne szczęście, że mogłam realizować się pod okiem tak wspaniałego specjalisty, jakim jest Pani Profesor, ale przede wszystkim, że mogłam współpracować z takim Człowiekiem.

Chciałam wyrazić szczególną wdzięczność dla Pana prof. dr. hab. Franciszka Duberta, bez którego moja praca doktorska nie mogłaby powstać. Dziękuję za życzliwość, wspaniałe lata owocnej współpracy, pogodę ducha, a przede wszystkim za zaraźliwy entuzjizm, który pomagał w trakcie chwil zwątpienia oraz za wsparcie, przekazywanie doświadczenia i pomoc w redagowaniu pracy.

Dziękuję mojemu promotorowi pomocniczemu dr inż. Magdalenie Wójcik-Jagle za pomoc i wsparcie, nie tylko w trakcie badań, ale także w czasie egzaminów.

Dziękuję także wszystkim pracownikom i doktorantom Instytutu Fizjologii Roślin PAN oraz Katedry Fizjologii Roślin, Hodowli Roślin i Nasiennictwa UR za rady i pomoc w trakcie wykonywania badań i spędzony wspólnie mile czas.

Chciałabym również podziękować Rodzinie i Bliskim mi osobom, którym dedykuję tą pracę, za cierpliwość i wytrwałość oraz wiarę w moje możliwości nawet wtedy, kiedy sama w siebie wątpiłam. Bez nich nie osiągnęłabym tego wszystkiego.

Badania wykonano w ramach programu wieloletniego MRiRW:
*„Zwiększenie wykorzystania krajowego białka paszowego dla produkcji wysokiej jakości
produktów zwierzęcych w warunkach zrównoważonego rozwoju”*,
obowiązujący w latach 2016-2020 ustanowionego na podstawie uchwały nr 222/2015
Rady Ministrów z dnia 15 grudnia 2015 r.

Spis treści

1. Wprowadzenie	9
2. Hipotezy badawcze	10
3. Cel pracy	10
4. Przegląd literatury	11
4.1. Opis botaniczny soi uprawnej	11
4.2. Wymagania klimatyczne i glebowe soi	12
4.3. Wymagania wodne soi	14
4.4. Znaczenie uprawy soi w Polsce	15
4.5. Symbioza z bakteriami z rodzaju Rhizobium i opis szczepionek bakteryjnych stosowanych w uprawie roślin strączkowych	16
4.6. Łagodzenie efektów stresowych na plonowanie soi	20
4.6.1. Reakcje roślin na wpływ stresów środowiskowych	20
4.6.2. Rola fitohormonów w reakcji odpornościowej na stresy	21
4.6.3. Biostymulatory stosowane w uprawie roślin	23
4.6.4. Reakcje obronne roślin na deficyt wody	24
4.6.5. Rola hormonów w reakcji roślin na suszę	26
4.7. Rola reduktazy azotanowej w przemianie azotanów	27
4.8. Rola cukrów w procesach życiowych roślin	28
4.9. Wykorzystanie metody oznaczenia dyskryminacji izotopów węgla ¹³C i azotu ¹⁵N	29
4.10. Ocena wpływu stresów środowiskowych na wzrost i rozwój roślin	32
4.10.1. Określanie stanu fizjologicznego roślin metodą pomiaru fluorescencji chlorofilu	33
4.10.2. Ocena natężenia stresu antyoksydacyjnego	34
5. Materiał i metody	36
5.1. Materiał nasienny	36
5.2. Układ doświadczeń	36
5.3. Analizy	44
5.3.1. Analiza warunków meteorologicznych	44
5.3.2. Wyznaczanie pojemności wodnej gleby w warunkach suszy	45
5.3.3. Analiza świeżej i suchej masy oraz parametrów plonu	45
5.3.4. Określenie liczby brodawek na korzeniach	45

5.3.5. Oznaczenie azotu w glebie	46
5.3.6. Oznaczenie zawartości białek rozpuszczalnych w liściach.....	46
5.3.7. Pomiar względnej zawartości wody (RWC)	47
5.3.8. Pomiar kinetyki fluorescencji chlorofilu <i>a</i>	47
5.3.9. Analiza fitohormonów metodą HPLC	48
5.3.10. Ocena dyskryminacji węgla ¹³ C	49
5.3.11. Określenie udziału azotu pobranego przez bakterie brodawkowe w ogólnym pobieraniu azotu przez rośliny, przy wykorzystaniu siarczanu amonu o zwiększonym udziale izotopu ¹⁵ N	50
5.3.12. Oznaczenie aktywności reduktazy azotanowej metodą <i>in vivo</i>	51
5.3.13. Oznaczenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych.....	51
5.3.14. Analiza ekspresji genów warunkujących wytwarzanie brodawek korzeniowych	52
5.3.15. Analiza statystyczna	55
6. Wyniki	56
6.1. Analiza warunków atmosferycznych	56
6.2. Doświadczenie 1. Wpływ terminu siewu nasion soi uprawnej na plonowanie.....	58
6.2.1. Doświadczenie 1A. Wpływ terminu siewu i szczepionek bakteryjnych na plonowanie soi uprawnej odmiany „Petrina”	59
6.2.2. Doświadczenie 1B. Wpływ terminu siewu i zastosowania agrowłókniny w okresie kiełkowania na plonowanie soi uprawnej odmiany „Abelina”, „Merlin” i „Petrina”	60
6.2.3. Doświadczenie 1C. Wpływ terminu siewu na plonowanie soi uprawnej odmiany „Abelina”, „Merlin” i „Petrina”	62
6.3. Doświadczenie 2. Wpływ biostymulatorów na plonowanie soi uprawnej.....	63
6.3.1. Doświadczenie 2A. Plonowanie soi odmiany „Petrina” pod wpływem biostymulatorów	63
6.3.2. Doświadczenie 2B. Analiza profilu hormonalnego w liściach oraz plonowania soi odmiany „Abelina” i „Merlin” pod wpływem biostymulatorów.....	64
6.4. Doświadczenie 3. Wpływ zastosowanych szczepionek bakteryjnych na plonowanie soi uprawnej	70
6.4.1. Doświadczenie 3A. Analiza fizjologicznych i biochemicznych parametrów odmiany „Petrina” pod wpływem szczepionek bakteryjnych	70
6.4.2. Doświadczenie 3B. Łagodzące działanie szczepionek bakteryjnych na rośliny odmiany „Malaga”, „Merlin” i „Petrina” w warunkach suszy	80

6.4.3. Ekspresja genów <i>Nod</i> pod wpływem szczepionek bakteryjnych od różnych producentów	115
7. Dyskusja	118
8. Wnioski	135
9. Streszczenie	138
10. Abstract	140
11. Literatura	142

Wykaz stosowanych skrótów:

ABA – kwas abscysynowy

ABS/CS_m – absorpcja energii w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię fotosyntetyzującej próbki i na chlorofil, w czasie zero (t=0) lub w czasie FM (M)

ATP – adenozyno-5'-trifosforan

cDNA – komplementarny kwas deoksyrybonukleinowy (*ang. complementary DNA*)

COBORU – Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych

CS_m – wzbudzana powierzchnia fotosyntetyzująca

DI₀/CS_m – rozpraszanie ciepłej energii wzbudzenia przez PSII w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię fotosyntetyzującej próbki

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

dUTP – 2'- deoksyurydino-5'-trifosforan

dNTP – deoksyrybonukleotydy trifosforanowe

ET – ewapotranspiracja

ET₀/CS_m – transport elektronów przez PSII fotosyntetyzującej próbki

gDNA – genomowy DNA

GTP – guanozyno-5'-trifosforan

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa

IAA – kwas indolilo-3-octowy

JA – kwas jasmonowy

KAT – katalaza

KIN – kinetyna

LCO – lipo-chito-oligosacharydy

mRNA-poli(A) – matrycowy RNA z „ogonem” składającym się z wielu nukleotydów adeninowych

MTN – masa tysiąca nasion

Nod – gen nodulacji (powstawania brodawek korzeniowych w wyniku infekcji bakterii symbiotycznych z rodzaju *Rhizobium*)

oligo-dT – starter złożony z 12-18 deoksytymidyn

POX – peroksydaza niespecyficzna (pula peroksydaz)

ppw – pełna pojemność wodna

PSII – fotosystem II

RC – centrum reakcji

RC/CS_m – zagęszczenie aktywnych centrów reakcji PSII redukujących plastochinon Q_A w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię fotosyntetyzującej próbki

RFT – reaktywne formy tlenu

RNA – kwas rybonukleinowy

RT-qPCR – łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym przeprowadzona na matrycy z cDNA uzyskanego w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji

RWC – relatywna zawartość wody

SA – kwas salicylowy

SOD – dysmutaza anionorodnika nadadtlenkowego

TOP – topolina (cytokinina)

TR_o/CS_m – przepływ przechwytywanej energii wzbudzenia przez PSII w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię fotosyntetyzującej próbki

ZEA – zeatina (cytokinina)

ZEN – zearalenon, toksyna produkowana przez grzyby z rodzaju *Fusarium*

1. Wprowadzenie

Soja zwyczajna jest gatunkiem, którego nasiona są cenne ze względu na zbalansowany skład aminokwasów. Białko soi jest wykorzystywane w przemyśle spożywczym oraz jako niezbędny dodatek do pasz dla zwierząt hodowlanych. Krajowa uprawa soi ze względów głównie klimatycznych, (krótki okres wegetacji w stosunku do wymagań tego gatunku), nie pokrywa zapotrzebowania na ten produkt. Fakt ten powoduje konieczność kosztownego importu białka sojowego z innych krajów. Z punktu widzenia gospodarczego, należałoby zwiększyć krajową produkcję soi, w celu zaspokojenia potrzeb rynku spożywczego i hodowlanego. Większy areał uprawy soi wymaga odpowiedniego doboru odmian tego gatunku, dostosowanych do danego regionu pod względem długości okresu wegetacyjnego, optymalnej ilości opadów i zakresu temperatur.

W niniejszej pracy przeprowadzono szereg doświadczeń, mających na celu sprawdzenie, czy w obliczu zachodzących zmian klimatycznych jest możliwa uprawa średnio późnych i późnych odmian soi w warunkach polskiego klimatu. Soja jest gatunkiem ciepłolubnym, wrażliwym na przygruntowe przymrozki występujące w okresie wiosennym i jesiennym. Ponadto, soja jest rośliną krótkiego dnia. Ważnym zatem elementem uprawy soi jest dobranie odpowiedniego terminu siewu. W przypadku każdego regionu należy przeanalizować średnie temperatury i sumę opadów. W pracy podjęto też temat wykorzystania biostymulatorów, w celu zwiększenia tolerancji soi na okresową suszę i zwiększenie plonu nasion. Do uprawy roślin strączkowych stosuje się często szczepionki zawierające bakterie z rodzaju *Rhizobium*. W doświadczeniach wykorzystano kilka szczepionek *Bradyrhizobium japonicum* od różnych producentów, w celu sprawdzenia czy różnią się one w oddziaływaniu na rośliny pod względem wiązania wolnego azotu, plonowania, a także łagodzenia stresu suszy.

2. Hipotezy badawcze

W pracy postawiono trzy hipotezy badawcze:

- 1) Zmiany klimatyczne zachodzące również w warunkach Polski, polegające m.in. na coraz częściej obserwowanych długich i ciepłych jesieniach, umożliwiają uprawę późnych odmian soi, stosując późniejszy termin siewu, oraz, ze względu na okresowe wysokie temperatury wiosną, istnieje możliwość wcześniejszego siewu tych odmian.
- 2) Biostymulatory i szczepionki *Bradyrhizobium japonicum* łagodzą skutki suszy, w roślinach soi uprawnej i zwiększają plon nasion.
- 3) Inokulacja nasion soi szczepionkami z *Bradyrhizobium japonicum* pochodzących od różnych producentów wpływa na zróżnicowanie liczby brodawek korzeniowych oraz na wielkość plonu nasion soi uprawnej poprzez różny udział azotu pobieranego z powietrza, w stosunku do azotu pobranego z gleby.

3. Cel pracy

Hipotezy badawcze weryfikowano na podstawie wyników uzyskanych w czterech doświadczeniach realizujących cztery główne cele badań.

Doświadczenie 1. Zbadanie, czy można uzyskać w warunkach polskiego klimatu plon nasion soi uprawnej przy wcześniejszym i późniejszym terminie siewu od zalecanego przez twórców odmiany.

Doświadczenie 2. Ocena wpływu takich stymulatorów, jak ASAHI SL, metanol, rozpuszczalny krzem i zearalenon, na plonowanie soi uprawnej.

Doświadczenie 3. Przebadanie wpływu szczepionek *Bradyrhizobium japonicum*, pochodzących od różnych producentów, na plonowanie soi uprawnej, także w warunkach suszy glebowej.

Doświadczenie 4. Zbadanie ekspresji genów *Nod*, warunkujących powstawanie brodawek korzeniowych soi uprawianej w obecności szczepionek bakteryjnych, pochodzących od różnych producentów.

4. Przegląd literatury

4.1. Opis botaniczny soi uprawnej

Rośliny strączkowe zajmują w królestwie roślin trzecie miejsce pod względem liczebności gatunków. Rodzina *Fabaceae* (bobowate) obejmuje około 19 500 gatunków, które stanowią 7% wszystkich roślin kwitnących [Raj 2022]. Jednym z gatunków tej rodziny jest soja uprawna (*Glycine max* L.), która od tysięcy lat uprawiana była głównie jako pasza dla zwierząt. Pochodząca z Chin i Azji Wschodniej soja, z biegiem lat została udomowiona, a ulepszenie składu chemicznego nasion poprzez hodowlę i nowoczesne systemy agrotechniczne spowodowały, że obecnie stała się jedną z najczęściej uprawianych roślin na świecie [Anderson 2019].

Gatunek soja uprawna (*Glycine max* L.), inaczej owłosiona lub warzywna, dzieli się w zależności od miejsca pochodzenia na cztery podgatunki: mandzurski, japoński, chiński oraz indyjski. W Polsce uprawia się odmiany należące do pierwszego, wymienionego podgatunku.

Soja należy do roślin jarych, jednorocznych. Okres wegetacji wynosi zazwyczaj 120–130 dni, w zależności od warunków środowiskowych. Nasiona kiełkują epigeicznie, czyli nad ziemią. Soja wytwarza palowy system korzeniowy. Od głównego korzenia odchodzi dużo mniejszych korzeni bocznych. Główna bryła korzeniowa sięga maksymalnie 25 cm w głąb podłoża. Soja jest rośliną, która żyje w symbiozie z bakteriami *Bradyrhizobium japonicum*. Nasiona soi są drobne, owalne, w kolorze żółtym. Po wysiewie pojawiają się liścienie, a następnie dwa pojedyncze liście o charakterystycznym jajowato-eliptycznym kształcie, zwane zarodkowymi. W późniejszym okresie pojawiają się naprzemianległe liście tzw. właściwe, które składają się z trzech mniejszych listków (Fot. 1). Wygląd liści właściwych jest cechą zmienną. Największe liście z całej rośliny zazwyczaj występują na środku pędu głównego. W zależności od warunków uprawy oraz odmiany, długość łodygi soi może wynosić od 30 do 100 cm, a nawet więcej. Łodyga jest sztywna, owłosiona i posiada liczne rozgałęzienia. Soja wytwarza zazwyczaj białe, ale czasami również fioletowe, drobne kwiaty, które zebrane są w grona do 25 kwiatów o budowie charakterystycznej dla roślin bobowatych. Na całej długości łodygi powstają owłosione strąki [Jasińska i Kotecki 2003].



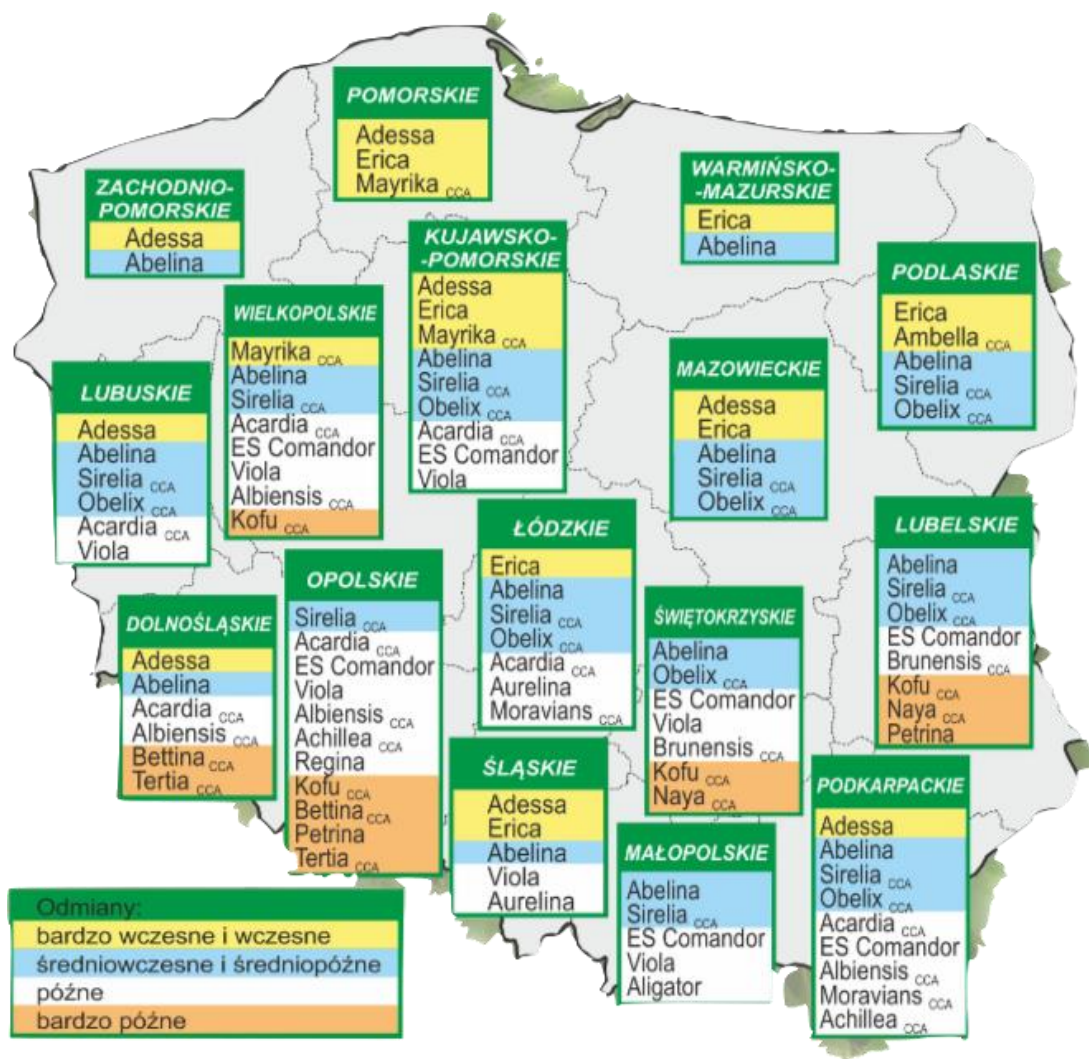
Fot. 1. Pokrój części nadziemnej rośliny soi uprawnej [autor: A. Szczerba]

4.2. Wymagania klimatyczne i glebowe soi

Spośród wszystkich roślin strączkowych soja ma największe wymagania glebowe i cieplne [Grzesiak i in. 1996]. Jest rośliną dnia krótkiego oraz ciepłolubną. Najlepiej rośnie na obojętnych glebach żyznych kompleksów pszennych w trzecim roku po oborniku [Pawłowski i in. 1990, Boros 2002]. Jest wrażliwa na przymrozki, a zatem jej siew jest uzależniony od warunków klimatycznych danego rejonu i zazwyczaj wypada w okresie od kwietnia do początku maja. Jest to gatunek bardzo wrażliwy na brak wody podczas kiełkowania, kwitnienia oraz zawiązywania strąków [Jasińska i Kotecki 2003; Kapusta 2012], jednakże w późniejszej fazie rozwoju, ze względu na rozwinięty system korzeniowy dobrze

znosi suszę, a owłosienie roślin zmniejsza transpirację [Jasińska i Kotecki 1993]. W warunkach klimatycznych Polski soja powinna być uprawiana głównie w części południowo-wschodniej i południowo-zachodniej. Wymaga bardzo starannej uprawy gleby.

Według COBORU typy odmian soi dzieli się na bardzo wczesne, wczesne, średnio-wczesne, średnio-późne, późne i bardzo późne. COBORU zaleca poszczególne odmiany do uprawy w konkretnych rejonach (Rys. 1).



Rys. 1. Odmiany soi zalecane do uprawy w konkretnych regionach Polski [COBORU 2022 - https://coboru.gov.pl/Publikacje_COBORU/IB/LOZ_bobowate_2021.pdf]

Obecnie na rynku dostępna jest szeroka gama odmian soi, dzięki której rolnik może dobrać odmianę odpowiednią do konkretnego regionu o danym przebiegu temperatur, opadów i długości okresu wegetacyjnego. Do najczęściej wybieranych odmian należą „Abelina”, „Malaga”, „Merlin” i „Petrina”. Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę tych odmian.

„Abelina” – odmiana zarejestrowana w 2016 roku, należy do grupy odmian średnio-wczesnych, sprawdza się w uprawie w całej Polsce. Charakteryzuje się bardzo dobrym wczesnym wigorem wzrostu oraz tolerancją na chłód. W doświadczeniach COBORU z lat 2014-2018 odmiana ta wykazała rekordowo stabilne i wysokie plony. Nasiona „Abeliny” zawierają dużą ilość białka i tłuszczu. Odmiana ta posiada wysoko osadzone najniższe strąki, co ułatwia zbiór kombajnem. Szczególnie polecana jest do uprawy w województwie śląskim, opolskim i wielkopolskim [hotfarm.pl].

„Malaga” – jedna z późnych odmian soi o długim okresie wegetacji, co pozwala na uzyskanie wysokich plonów. Idealna do uprawy na terenie południowej Polski. Charakteryzuje się najwyższą MTN (Masa Tysiąca Nasion), dużą liczbą strąków na roślinie i wysokim potencjałem plonowania. Nasiona zawierają wysoką zawartość tłuszczu [hotfarm.pl].

„Merlin” – odmiana bardzo wczesna, zarejestrowana w Unii Europejskiej już w 1997 roku. Nadaje się do uprawy na terenie całej Polski ze względu na wysoką odporność na niekorzystne warunki termiczne. Charakteryzuje się szczególnie wczesnym wigorem oraz tolerancją na chłód, co warunkuje wysoki i stabilny plon. Odmiana ta posiada też doskonałą zdolność do regeneracji w przypadku uszkodzeń spowodowanych złymi warunkami atmosferycznymi lub powstałych w wyniku żerowania zwierząt. „Merlin” idealnie nadaje się dla producentów, którzy dopiero zaczynają uprawiać soję. Nieodpowiednia praktyka agrotechniczna nie powoduje spowolnienia rozwoju roślin i mniejszego plonu. Polecana do uprawy w województwie małopolskim, opolskim, podkarpackim oraz zachodniopomorskim [saatbau.pl].

„Petrina” – odmiana zarejestrowana jako bardzo późna, „schodzi” z pola w trzeciej dekadzie września. Wytwarza białe kwiaty i żółte nasiona. Daje wysoki plon, a nasiona są bogate w białko. Odmiana ta charakteryzuje się odpornością na choroby i wyleganie. Najlepiej rośnie na glebach średnich i lepszych, przewiewnych, o pH zbliżonym do obojętnego. „Petrina” znajduje się na liście odmian zalecanych do uprawy w województwie opolskim [agrokol.pl].

4.3. Wymagania wodne soi

Ważnym parametrem agrometeorologicznym, który określa potencjalne możliwości parowania wody z gruntu jest ewapotranspiracja wskaźnikowa (ET). Obejmuje ona parowanie wody z komórek roślinnych czyli transpirację oraz ewaporację – parowanie z gruntu.

Transpiracja jest ważnym procesem, ponieważ plon jest liniowo związany z ilością wody, jaka przepływa przez roślinę w czasie wzrostu. Wpływ na wskaźnik ET ma promieniowanie słoneczne, temperatura powietrza, wilgotność względna oraz wiatr.

Różnica pomiędzy ewapotranspiracją wskaźnikową a opadem w danym czasie wskazuje na potencjalny niedobór lub nadmiar opadów. Zużycie wody zmienia się w ciągu sezonu w zależności od warunków pogodowych.

Wymagania wodne soi uprawnej zależne są od odmiany oraz jej klasy wczesności, a także od gleby, warunków pogodowych w czasie okresu wegetacji i terminu wysiewu. Wymagania te wahają się pomiędzy 360 a 600 mm w czasie roku [<http://crops.missouri.edu/irrigation>, Kranz i in. 2012]. Najważniejszym czasem uprawy dla soi, krytycznym ze względu na wymagania wodne, jest okres od początku kwitnienia do wypełniania nasion. Brak w tym okresie wystarczającej ilości wody, może znacznie wpłynąć na zmniejszenie plonów.

4.4. Znaczenie uprawy soi w Polsce

Soja uprawna należy do jednych z najstarszych, a zarazem najbardziej wartościowych pod względem rolniczym roślin na świecie [Boczar 2016]. Ze względu na dużą zawartość białka w nasionach (35 do 42%), charakteryzującego się wysoką wartością biologiczną, stanowi cenne źródło pokarmu dla ludzi oraz zwierząt [Stawiński 2016; Kalinowski 2018].

Polska znajduje się w strefie klimatycznej umiarkowanej, co powoduje, że warunki środowiskowe utrudniają uprawę soi. Również państwa sąsiadujące z Polską mają problem z uprawą tego gatunku na skalę, która zaspokoiłaby zapotrzebowanie na białko roślinne w Europie Środkowej [Augustyńska i in. 2019]. Niewystracająca ilość białka paszowego pochodzącego z roślin strączkowych, w Polsce i innych krajach Unii Europejskiej sprawia, że konieczne jest zwiększenie importu śruty i nasion roślin bobowatych z innych krajów, produkujących je na większą skalę. Ma to miejsce szczególnie w przypadku soi, a konkretnie śruty sojowej, jednakże jej import generuje dodatkowe koszty. Ministerstwo Finansów podało, że w sezonie 2016/2017 import śruty sojowej do naszego kraju wyniósł 2283,4 tys. ton, głównie z Argentyny [Rynek pasz 2018].

Powoduje to uzależnienie Polski od innych krajów, zarówno UE, jak i dalszych, które poprzez różne ograniczenia prawne nadają kształt handlowi międzynarodowemu.

Komplikacje na światowym rynku rolnym i spożywczym powodują często trudności w pozyskaniu białka pochodzenia roślinnego z zagranicy. Wytyczne UE ściśle określają

jednak, że w przypadku produkcji drobiu i trzody chlewnej wymagane jest białko pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, dlatego tak ważne jest, aby Polska zapewniła sobie bezpieczeństwo w zakresie dostatecznej ilości białka paszowego [Czekała 2016]. Mogłoby to nastąpić poprzez intensyfikację produkcji, zwiększenie areału oraz zastosowanie zabiegów agrotechnicznych, pozwalających na efektywną uprawę soi w warunkach klimatycznych naszego kraju [Święcicki i in. 2007].

4.5. Symbioza z bakteriami z rodzaju *Rhizobium* i opis szczepionek bakteryjnych stosowanych w uprawie roślin strączkowych

Rośliny z rodziny *Fabaceae* są zdolne do wytwarzania brodawek korzeniowych, które są efektem molekularnej interakcji rośliny z odpowiednimi szczepami rizobiów, przy czym każdy gatunek rośliny tworzy symbiozę z innym szczepem bakterii glebowych [Graham i Vance 2003]. Symbioza stwarza możliwość wiązania azotu atmosferycznego, którego zredukowana forma jonu amonowego jest dostępna dla roślin, co pozwala ograniczyć nawożenie ich nawozami azotowymi i ma korzystny wpływ na środowisko [Gaweł 2011; Gretel i in. 2011]. Symbioza pomiędzy roślinami strączkowymi, a rizobiami to reakcja charakteryzująca się wysoką swoistością oddziaływania na wszystkich etapach interakcji, zaczynając od infekcji bakteryjnej przez rozwój brodawek, aż po wiązanie azotu [Wang i in. 2012]. Noduliny to białka syntetyzowane w korzeniach roślin bobowatych w wyniku infekcji bakteriami z rodzaju *Rhizobium* [Tylman i Kowalczyk 2012].

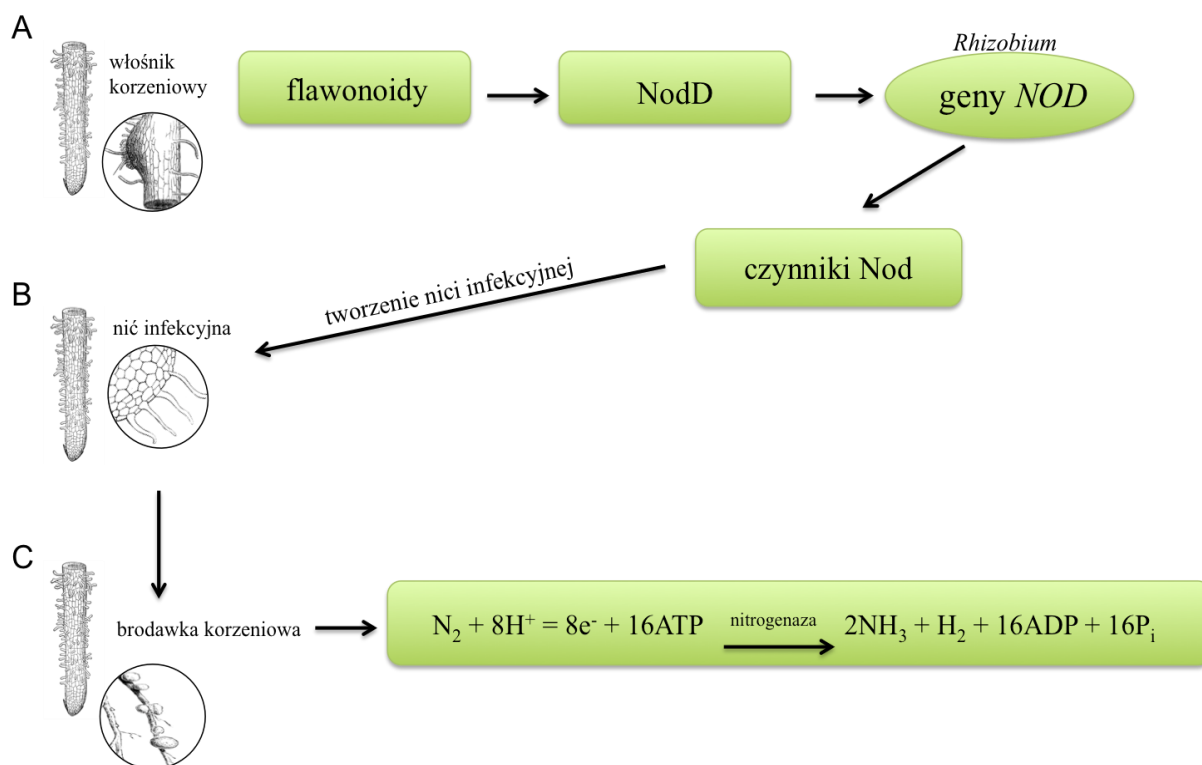
Powstanie brodawek to proces wymagający aktywnego zaangażowania zarówno rośliny–gospodarza, jak i kompatybilnych rizobiów. Cały proces rozpoczyna się poprzez wydzielanie przez roślinę do ryzosfery związków o charakterze fenolowym. Są to głównie flawonoidy, które wychwycone przez bakterie nityfikacyjne aktywują ekspresję czynnika transkrypcyjnego NodD, który z kolei aktywuje ekspresję genów nodulacji (*Nod*), czyli brodawkowania (Rys. 2) [Oldroyd i in. 2009].

Czynniki Nod są lipo-chito-oligosacharydami (LCO) syntetyzowanymi przez rizobia i działają jako cząsteczki sygnałowe w początkowych etapach inicjacji symbiozy z roślinami bobowatymi [Long 1996]. Białkami receptorowymi wiążącymi czynniki Nod są błonowe receptorowe kinazy białkowe, zawierające zewnętrzną domenę kinazową LRR (leucine rich repeat). W roślinach soi kinazy typu LRR-RLK z cytoplazmatyczną domeną serynowo-treoninowej kinazy białkowej są kodowane przez geny *NORK* (NODULATION RECEPTOR KINASE), co skutkuje inicjacją złożonej kaskady sygnałowej, która ostatecznie prowadzi do

powstania brodawek [De Mita i in. 2007; Tylman i Kowalczyk 2012]. Fasola pospolita kontroluje liczbę brodawek poprzez wbudowany mechanizm sygnalizacji, znany jako autoregulacja nodulacji (AON – Autoregulation of Nodulation), w którym pośredniczą hormony peptydowe zwane CLAVATA/ESR-related (CLE) [Muñoz-Azcarate i in. 2017]. W soi AON obejmuje sygnalizację na duże odległości, wymagającą interakcji peptydów CLE INDUCED RHIZOBIA (RIC1/RIC2) z kinazą receptora autoregulacji brodawkowania (*NARK* – NODULE AUTOREGULATION RECEPTOR KINASE) w liściu, a następnie zahamowaniem powstawania brodawek poprzez wytwarzanie indukowanego azotanami peptydu CLE (kodowanego przez gen *NIC*), który oddziałuje z *NARK* w korzeniu [za Muñoz-Azcarate i in. 2017].

Gen *NIC1* silnie kontroluje metabolizm azotanów w procesie nodulacji. Gen ten działa lokalnie, hamując powstawanie brodawek w zależności od ekspresji *NARK* [Jeudy et al. 2010; Reid et al. 2011]. Geny kodujące noduliny ulegają swoistej ekspresji w brodawkach korzeni roślin strączkowych podczas symbiozy z bakteriami z rodzaju *Rhizobium* [Legocki i Verma, 1980]. Geny te zostały wyizolowane z wielu roślin strączkowych [Delauney i Verma, 1988], ale do tej pory najszerzej scharakteryzowano je w soi. Sklonowane geny kodują noduliny o znanych funkcjach: leghemoglobinę, urykazę II (nodulina-35), syntetazę glutaminy (GS) oraz syntetazę sacharozy (nodulina-100) [Bergmann i in., 1983, Lee i Verma, 1984, Thummler i Verma, 1987]. Nodulina-26 jest błonowym kanałem jonowym bakteroidu, jednak funkcje większości izolowanych genów noduliny pozostają do wyjaśnienia, a wiele sklonowanych genów nodulin identyfikuje się wyłącznie na podstawie ich mas cząsteczkowych [Delauney i Verma, 1988, Verma i Delauney, 1988].

Substancje powstające w wyniku działania czynników Nod mogą być stosowane jako stymulatory roślin, potencjalnie zwiększając biomasę i jakość plonu roślin uprawnych [Kidaj 2011; Oldroyd i in. 2011; Wang i in. 2012]. Wynikiem symbiozy jest obustronna wymiana substancji pomiędzy rośliną bobowatą, a kompatybilnymi rizobiami [Martyniuk 2008, 2012]. Azot atmosferyczny w wyniku wielu procesów przekształcany jest w przyswajalną formę azotu amonowego [Gage 2004; Ferguson 2013].



Rys. 2. Schemat symbiozy zachodzącej pomiędzy korzeniami rośliny z rodziny bobowatych a bakteriami z rodzaju *Rhizobium* [według Laranjo i in. 2014]; (ATP – adenozynotrifosforan, ADP – adenozynodifosforan, Pi – reszta kwasu ortofosforowego, NH₃ – amoniak):

- roślina wydziela flawonoidy, które aktywują u bakterii syntezę czynników NodD (regulator transkrypcji wspólnych genów *NOD*),
- czynniki Nod są specyficznymi białkami, które ułatwiają odnalezienie genów rozpoznawanych przez specyficzne receptory rośliny, a to powoduje tworzenie nici infekcyjnej i rozwój brodawki korzeniowej, którą zasiedlają bakterie symbiotyczne,
- wewnątrz brodawki bakterie przekształcają się w bakteroidy, które redukują N₂, zaopatrując roślinę w przyswajalne dla niej formy azotu (NH₃ lub glutaminę) [Laranjo i in. 2014].

Każdy gatunek roślin strączkowych posiada swój „współpracujący” szczep bakterii. Wynika to z tego, iż brodawki różnią się między sobą anatomicznie i fizjologicznie. W przypadku soi są to bakterie *Bradyrhizobium japonicum*, które powodują wytwarzanie brodawek typu zdeterminowanego w wyniku rozrostu, a nie podziału komórek znajdujących się w korze zewnętrznej korzenia [Stasiak i in. 2016]. Liczba brodawek jest zależna od stadium rozwoju rośliny. Zaraz po wykiełkowaniu nasion pojawiają się na korzeniu pierwsze brodawki, ale proces przyswajania azotu rozpoczyna się, gdy roślina wytworzy pierwszą lub drugą parę trójlistków. Według Alves i in. [2003] największa możliwa liczba brodawek powstaje na etapie tworzenia się nasion w strąkach. Przeciwnego zdania jest Gabryś [2002],

twierdząc, że bakterie asymilują azot atmosferyczny najintensywniej na początku kwitnienia.

Symbioza bakterii brodawkowych z roślinami z rodziny bobowatych to ważny proces, który wchodzi w skład wielu reakcji związanych z obiegiem azotu w przyrodzie. Umożliwia roślinom wzrost na glebach ubogich w ten pierwiastek. W ostatnich latach obserwuje się zainteresowanie wykorzystaniem substancji wytwarzanych przez czynniki Nod w stymulacji wzrostu i rozwoju roślin, zwłaszcza, gdy warunki uprawy są niekorzystne a rośliny narażone są na stresy, na przykład na suszę [Atti i in. 2005].

Szczepionki bakteryjne są powszechnie stosowane w uprawie roślin na całym świecie, również w Polsce. Powstają na bazie różnych szczepów drobnoustrojów. Nośnikiem mikroorganizmów może być perlit, zmielony torf lub węgiel brunatny [Martyniuk 2009]. Wytworzone w ten sposób preparaty są wykorzystywane do otoczkowania nasion roślin bobowatych, co jest dużym ułatwieniem przy wprowadzaniu dużej liczby bakterii bezpośrednio do strefy korzeniowej siewek roślin. Większa ilość rizobiów w glebie zwiększa szansę bakterii brodawkowych na nawiązanie skutecznej symbiozy z rośliną. Roślina strączkowa zapewnia bakteriom optymalne warunki wzrostu oraz jest dla niej źródłem węgla, a te w zamian dostarczają roślinie przyswajalne formy azotu [Martyniuk 2011].

W Polsce Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi dopuszcza do obrotu preparaty mikrobiologiczne, które zawierają bakterie symbiotyczne, spełniające wymogi procedury rejestracyjnej. Obejmuje ona dokładne dane dotyczące składu, opisu procesu produkcyjnego i sposobu stosowania produktu. Obowiązkowe jest także przedstawienie wyników doświadczeń laboratoryjnych i polowych, które potwierdzają skuteczność rejestrowanego biopreparatu w praktyce. Z tego powodu, szczepionki bakteryjne są biopreparatami o sprawdzonej efektywności i dobrej jakości po względem mikrobiologicznym [Martyniuk 2011; Sobiczewski 2011]. Obecnie rolnicy mają do dyspozycji szeroki wybór szczepionek bakteryjnych dla roślin bobowatych, po które chętnie sięgają, ponieważ oprócz zwiększenia plonu pozwalają prowadzić zrównoważone i ekologiczne rolnictwo, które nie wymaga sztucznego nawożenia azotem [Zamłyńska i in. 2020]. Dostępne na rynku biopreparaty to m.in.: HiStick® Soy, Nitroflora, Nitragina Biofood, Nitragina IUNG, Nitraza, *Rhizobium* Bio-Gen, Mikroflor czy Agrarius.

4.6. Łagodzenie efektów stresowych na plonowanie soi

4.6.1. Reakcje roślin na wpływ stresów środowiskowych

W naturalnym środowisku rośliny narażone są na abiotyczne i biotyczne stresy środowiskowe, wpływające na ich wzrost i rozwój [Wiedner 2015]. Stresy abiotyczne wywoływane są przez czynniki chemiczne i fizyczne. Należą do nich między innymi niekorzystna temperatura, zasolenie podłoża, brak lub nadmiar wody, słabe lub silne promieniowanie oraz jony metali ciężkich. Stresy biotyczne powstają na skutek działania czynników pochodzących z przyrody ożywionej, czyli szkodników, patogenów lub roślin pasożytniczych [Wiedner 2015]. Stresy biotyczne odpowiedzialne są za 10 – 20% strat w rolnictwie światowym [Kreps i in. 2002], natomiast aż 80 – 90% powierzchni upraw światowej gospodarki uprawnej narażonych jest na czynniki pochodzenia abiotycznego [Cramer i in. 2011].

Naturalne środowisko roślin sprzyja działaniu niekorzystnych czynników środowiskowych. Pojęcie stresu określane jest jako bodziec, który działa na organizm, wywołując znaczące zmiany fizyczne oraz strukturalne. Dochodzi do zaburzeń lub zahamowania prawidłowego funkcjonowania organizmu rośliny [Jones 1989; Mahajan i in. 2005]. Reakcja roślin dzieli się na:

- fazę alarmu – w tym czasie następuje destabilizacja strukturalna i funkcjonalna komórek, która uniemożliwia prawidłowe funkcjonowanie organizmu,
- fazę odporności (hartowanie) – układ się stabilizuje,
- fazę wyczerpania (czynnik stresowy trwa zbyt długo i w zbyt silnym natężeniu) – następuje nieodwracalne uszkodzenie komórek, a w konsekwencji śmierć rośliny [Larcher 2003].

Zasadnicza większość stresów przyczynia się do wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu (RFT), cytozolowych jonów Ca^{2+} oraz aktywację kaskady kinaz [Dodd i in. 2010; Jaspers i Kangasjärvi 2010; Rodriguez i in. 2015]. Stresy abiotyczne powodują zmiany stężeń takich hormonów, jak kwas jasmonowy, abscysynowy, salicylowy oraz etylen [Vahtera i Brosche 2011]. Uniwersalna odpowiedź rośliny na stres ma związek z tzw. odpornością krzyżową, co oznacza, że jeden stres może powodować wzrost odporności na inny niekorzystny czynnik [Gasch 2007].

W ostatnich latach szczególną uwagę poświęca się badaniom mającym na celu zminimalizowanie, a nawet likwidację niekorzystnego działania stresu środowiskowemu na

rośliny. Na podstawie wielu badań określono substancje, które wykazują działanie antystresowe dla rośliny. Należą do nich fitohormony, biostymulatory i biopreparaty takie jak nawozy, środki ochrony oraz szczepionki bakteryjne. Fitohormony są substancjami organicznymi, które w niewielkich ilościach wspomagają lub hamują procesy fizjologiczne np.: tworzenie korzeni, kiełkowanie lub starzenie się roślin [Matysiak 2009]. Biopreparaty wpływają na jakość i wielkość plonu, stymulują rozwój rośliny oraz poprawiają odporność rośliny na czynniki stresowe. Preparaty pochodzenia biologicznego pozwalają ograniczyć nawożenie sztucznymi nawozami oraz ilość oprysków chemicznych. Jest to bardzo istotne w zrównoważonej gospodarce i wspiera ochronę środowiska przyrodniczego [Zamłyńska 2020].

Łagodzenie działania stresów w roślinach jest ważną kwestią, która wynika nie tylko z postępu technologicznego w rolnictwie, ale również ze względu na potrzebę poprawy jakości roślin uprawianych w różnych warunkach środowiskowych [Tester i Laugridge 2010]. Dzięki takiemu rozwiązaniu, rolnicy mogą również wykorzystywać do uprawy roślin gleby gorszej klasy [Gisladotti i Stocking 2005]. W celu złagodzenia stresu u roślin niezbędne jest dokładne poznanie fizjologicznych i metabolicznych mechanizmów, które są uruchamiane w celu uzyskania „plastyczności” fenotypowej. Skutkuje to ograniczeniem uszkodzeń oraz zdolnością do przetrwania wielu niekorzystnych warunków wzrostu, które często się na siebie nakładają [Urano i in. 2010; Debnath i in. 2011; Zivy i in. 2015].

4.6.2. Rola fitohormonów w reakcji odpornościowej na stresy

Fitohormony to substancje wytwarzane przez rośliny, które kontrolują wzrost i rozwój komórek. Służą w percepcji bodźców ze środowiska rośliny oraz biorą udział w transdukcji sygnałów zachodzącej pomiędzy komórkami. Wytwarzane są w młodych tkankach oraz merystemach, a następnie transportowane do miejsc docelowych. Ilość i miejsce pojawienia się fitohormonów w roślinie zależne jest także od czynników środowiskowych [Davies 2004; Öpik i Rolfe 2005].

Rośliny wykształciły mechanizmy, które są w stanie unikać lub tolerować czynniki stresowe. Unikanie stresu polega na przystosowaniu fizjologicznym do aktualnych warunków rozwojowych lub modyfikacje morfologiczne, mające na celu zwiększenie tolerancji na stres. W czasie suszy rośliny są w stanie przejść w stan anabiozy lub np. akumulować substancje ochronne oraz uruchomić mechanizmy, które są w stanie naprawić lub modyfikować mechanizmy metaboliczne [Płażek 2004].

Poszczególne hormony są intensywniej produkowane, gdy roślina wzrasta w niekorzystnych dla niej warunkach stresowych. Na przykład, w czasie niedoboru wody obserwuje się zwiększony poziom kwasu abscysynowego (ABA) oraz indolilo-3-octowego (IAA) [Kende i Zeevart 1997]. Kwas abscysynowy nazywany jest hormonem stresu, ponieważ obserwuje się wzrost jego stężenia w warunkach niekorzystnych dla roślin np. takich jak zaciemnienie, susza czy podtopienie roślin [Milborrow 2001; Ikegami i in. 2009; Khandelwal i in. 2010]. Przy niedoborze wody, ABA powoduje zamknięcie szparek, co ogranicza kolejne straty wody, zwiększając tym samym odporność rośliny na inne stresy środowiskowe [MacRobbie 2000; Li i in. 2000; Zhou i in. 2005].

Udział w reakcjach związanych ze stresem roślin bierze także kwas jasmonowy i jego pochodne (jasmoniany). Związki te przekazują sygnał między aktywowanym receptorem, a czynnikami transkrypcyjnymi, kontrolującymi ekspresję genów odpowiedzialnych za reakcję odpornościową rośliny na dany czynnik stresowy [Berger 2002, Wilmowicz i in. 2012; Jankiewicz 2003].

Duże znaczenie w ochronie roślin przed stresem abiotycznym przypisuje się kwasowi salicylowemu (SA). Zwiększa on tolerancję roślin na różne szkodliwe bodźce płynące ze środowiska. W przypadku wystąpienia suszy, SA indukuje wzrost stężenia auksyn w roślinie. Wykazano, że hormon ten w warunkach stresowych dla rośliny powoduje zwiększenie masy pędów i korzeni roślin. Pod jego wpływem zwiększa się również zawartość chlorofilu w liściach oraz potencjał osmotyczny i stosunek jonów K^+/Na^+ [Kaydan i in. 2007]. Udowodniono również wpływ kwasu salicylowego na regenerację pąków kwiatowych i tworzenie się bulw [Handro i in. 1997].

Cytokininy to kolejna grupa hormonów roślinnych, która mimo, że słabo zbadana pod kątem odpowiedzi na stres, wykazuje cechy hormonów „stresowych”. Hormony te wzmacniają odpowiedź obronną rośliny za pośrednictwem szlaku przekazywania sygnału indukowanego kwasem salicylowym [Arqueso i in. 2012; Choi i in. 2010, 2011; Hwang i in. 2012]. Wykazano, że indukcja syntezy cytokinin spowodowana infekcją powoduje akumulację fitoaleksyn np. skopoletyny i kapsidiolu. Fitoaleksyny to niskocząsteczkowe związki syntetyzowane w ramach reakcji obronnych rośliny, głównie na stresy biotyczne (Tiku 2020). Niewątpliwie, cytokininy biorą udział w reakcjach obronnych roślin, jednakże molekularny mechanizm ich działania pozostaje nadal niejasny. Zagadnienie dodatkowo komplikuje fakt ich zróżnicowanego poziomu w roślinach należących do różnych gatunków [Grosskinsky i in. 2011]. Hormonami, które regulują odpowiedź rośliny na stres, a szczególnie stres suszy, są także gibereliny [Kohli i in. 2013; Wani i in. 2016; Ullah i in.

2018]. Wzmoczony metabolizm oraz ścieżki sygnałowe fitohormonów obserwuje się także przy obniżonej wilgotności w glebie oraz po ustąpieniu suszy [Wang i in. 2011; Yuan i in. 2011; Hu i Yu, 2014; Skubacz i in. 2016; Ju i in. 2019].

4.6.3. Biostymulatory stosowane w uprawie roślin

Obecnie w rolnictwie wykorzystuje się wiele substancji stymulujących, w celu poprawy jakości i wielkości otrzymanego plonu. Stymulatory mogą być pochodzenia naturalnego, jak i wyprodukowane poprzez syntezę chemiczną. Stosowane są preparaty, które mają już wieloletnią tradycję, a także nowe, oparte na nowoczesnych procesach technologicznych. Lista dostępnych na rynku biopreparatów jest nadzorowana przez Państwo, gdyż ich zastosowanie wiąże się z uwalnianiem ich do środowiska [Matyjaszczyk 2015]. W literaturze polskiej i zagranicznej „biostymulator” oznacza preparat pozytywnie wpływający na rozwój roślin uprawnych, ale nieposiadający działania nawozowego [Gawrońska 2008]. Biostymulatory stymulują syntezę naturalnych hormonów oraz aktywują niektóre szlaki metaboliczne roślin. Nie biorą natomiast czynnego udziału w regulowaniu procesów życiowych [Maksymowicz 2016]. Regulacja procesów fizjologicznych u roślin przyczynia się do regeneracji roślin po ustaniu stresu [Michalski i in. 2008].

Na rynku dostępnych jest kilka substancji o charakterze stymulującym wzrost roślin. Jedną z nich jest stosowany w ogrodnictwie i rolnictwie ASAHI SL [Pusz i Płaskowska 2008]. Preparat ten składa się ze związków fenolowych takich jak orto- i para-nitrofenolan sodu oraz 5-nitroguajakolan sodu. Związki te mają wpływ na wzrost i rozwój roślin [Słowiński 2004, Kozak 2009].

Inną substancją o stymulującym działaniu jest zearalenon (ZEN). Związek ten jest substancją pochodzenia endogenicznego, wytwarzaną przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. Wiele badań donosi też, że jest to substancja o charakterze hormonalnym [Wang i Meng 1990]. Pod względem chemicznym jest to lakton kwasu 6 - (10 - hydroksyl - 6 - okso - Δ^1 - trans - undecenylo) - β - rezorcylowego (Rys. 12). Zearalenon jest nazywany inaczej F2 toksyną produkowaną na przykład przez *Fusarium graminearum*. Toksyna ta o działaniu estrogennym wywołuje wiele zaburzeń chorobowych układu rozrodczego zwierząt hodowlanych, które karmione są paszą porażoną tym grzybem. Cząsteczka ZEN jest „elastyczna”, ponieważ może przyjmować różne konformacje przestrzenne. Dzieje się tak za sprawą tylko jednej grupy karbonylowej i jednego wiązania podwójnego, co powoduje, że jest ono wysoce nasycone [Biesaga-Kościelniak 2001]. Szereg badań świadczy o tym,

że zearalenon ma również charakter hormonalny. Wpływa na wzrost i rozwój roślin m.in. poprzez zwiększenie aktywności α -amylazy i β -glukozydazy w kiełkujących nasionach kukurydzy oraz stymulację powstawania zawiązków wegetatywnych pędów w tkankach kalusowych [Mirocha i in. 1968, Vinello i Macri 1978]. Stosowanie tego związku jako substancji stymulującej wzbudzało kontrowersje spowodowane obawami, czy wprowadzanie tej toksyny do środowiska jest bezpieczne. Badania prowadzone przez Biesagę-Kościelniak i Filek [2010] oraz Dziurkę i in. [2019] wykazały, że ZEN inicjuje proliferację tkanki kalusowej i różnicowanie komórek, a ponad to może zastępować działanie chłodu w procesie wernalizacji.

Właściwości stymulujące wykazuje również dolistnie podawany metanol. Jest to alkohol, bezbarwny o charakterystycznym zapachu. Bardzo dobrze rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych, a także w wodzie, etanolu oraz eterze dietylowym. Produkuje się go z gazu syntezowego lub węgla [Chmielniak i in. 2009]. Opryski tą substancją mają wpływ na rozwój rośliny i powodują zwiększenie plonu. Badania wykazały, że największy efekt stymulujący miały zastosowane stężenia 5 – 10%. Wyższe stężenie natomiast do 20% powodowało negatywny, a nawet toksyczny efekt wywołujący zaburzenia metaboliczne roślin [Behrouzgar i Yarnia 2017].

Również krzem jest coraz powszechniej badany pod kątem korzystnego działania w roślinie w czasie oddziaływania stresów środowiskowych. Pierwiastek ten jest drugim pod względem rozpowszechnienia na kuli ziemskiej [Heiserman 1997]. W glebie występuje w postaci krzemionki, która nie jest do końca dostępna dla roślin [Grenda i Skowrońska 2004; Sommer i in. 2006]. Krzem stosuje się w formie oprysków. Właściwa forma krzemu podana dolistnie impregnuje epidermę liścia. Powstająca powłoka utwardza liść, chroniąc go przed uszkodzeniami mechanicznymi, a także zmniejsza prawdopodobieństwo porażenia przez choroby grzybowe i szkodniki [Fauteuxi in. 2005; Robak i Ostrowska 2006; Sacała 2009]. Wykazano także, że krzem zmniejsza skutki niedoboru wody oraz zwiększa wydajność fotosyntezy [Romero-Aranda i in. 2006]. Udowodniono, że krzem może mieć korzystny wpływ na odżywianie roślin poprzez wzmocnienie absorpcji azotu, fosforu, potasu i cynku [Pilon i in. 2013; Mehrabanjoubani i in. 2017].

4.6.4. Reakcje obronne roślin na deficyt wody

Ostatnie lata pokazują, że wiele regionów świata zmaga się z niekorzystnymi czynnikami środowiskowymi, które wpływają na produktywność roślin [Mahajan i Tuteja

2005, Rengasamy 2006]. Susza i wahania zawartości wody w glebie to główne czynniki ograniczające wysokość plonu [Lambers i in. 2008]. Zmiany klimatyczne na całym świecie skutkują wzrostem średniej rocznej temperatury, stopowieniem rejonów strefy umiarkowanej, nierównomierną ilością opadów oraz dużymi wahaniami temperatury w sezonie wegetacyjnym.

Warunki klimatyczne Polski charakteryzują się wysokim prawdopodobieństwem występowania przymrozków i suszy, która jest następstwem zbyt małych opadów deszczu i mniejszym zapasem wody glebowej pochodzącej z zimowych opadów śniegu. Ponadto, problem niedoboru wody w glebach Polski potęguje się, gdyż 60% powierzchni wykorzystanej pod uprawę to gleby bardzo lekkie i lekkie, charakteryzujące się niską pojemnością polową wody. Sytuacja ta wymusza nacisk na badania, które będą prowadzić do wytworzenia nowych, bardziej tolerancyjnych i odpornych na suszę odmian roślin uprawnych wysiewanych wiosną, w tym roślin strączkowych [Hatfield 2001; IUNG 2010].

Soja, tak jak wszystkie rośliny z rodziny bobowatych, jest szczególnie narażona na stres suszy oraz niedobór wody, zwłaszcza w takich fazach rozwojowych, jak kiełkowanie i wschody oraz kwitnienie i zawiązywanie strąków [Jasińska i Kotecki 1993].

Niedobór wody w roślinie na różnych etapach życia powoduje powstawanie w komórkach RFT w dużych ilościach, co nazywane jest stresem oksydacyjnym. Innym skutkiem suszy może być zwalnianie lub całkowite zahamowanie procesu fotosyntezy poprzez uszkodzenie fotosystemów [Li i in. 2015]. Zamykanie aparatów szparkowych to jedna z pierwszych reakcji rośliny na stres wywołany niedostateczną ilością wody. Skutkiem tego zjawiska jest zmniejszenie transpiracji [Chaves i in. 2003]. Inną konsekwencją stresu suszy jest zmniejszenie ilości wody w komórkach i obkurczenie wakuoli, co ma wpływ na procesy wzrostowe komórek oraz organów [Marty 1997].

Rośliny wykształciły różne strategie unikania skutków suszy. „Ucieczka” polega na zakończeniu przez roślinę wszystkich etapów rozwojowych przed okresem występowania suszy. Taka forma obrony zazwyczaj występuje dużo wcześniej niż działanie suszy. Mimo, że tę strategię wykorzystują rośliny o dużej tolerancji na suszę, to zatrzymanie procesów rozwojowych powoduje duże straty w plonie [Turner i in. 2001].

„Unikanie” suszy to zdolność zachowania wysokiej zawartości wody w tkankach organizmu, pomimo deficytu wody w siedlisku. Rośliny zmuszone są do tworzenia bardziej rozbudowanego systemu korzeniowego, który sięga w głębsze obszary gleby. Symbioza z grzybami mikoryzowymi także pozwala roślinie „radzić sobie” w czasie suszy [Selosse i Le Tacon 1998]. Modyfikacje morfologiczne, fizjologiczne, przemykanie aparatów szparkowych

i akumulacja związków osmotycznie czynnych, powodujących spadek potencjału wody w komórkach (Ψ_k) to inne rodzaje przystosowania się roślin do krótko- i długotrwałej suszy [Parry i in. 1992].

4.6.5. Rola hormonów w reakcji roślin na suszę

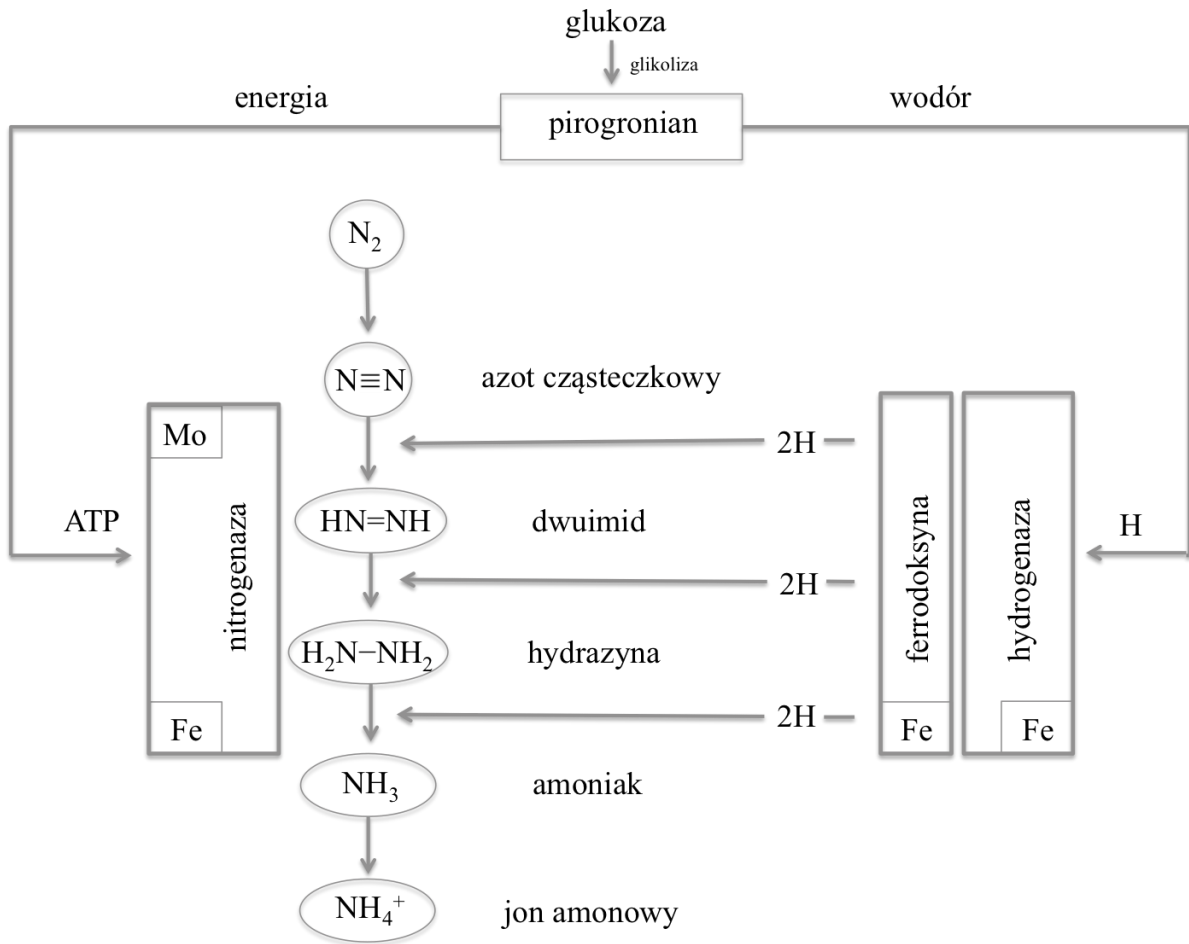
Niedostatek wody powoduje fizjologiczne i biochemiczne zmiany w roślinach. Stres ten wywołuje szereg reakcji obronnych roślin, mających na celu usuwanie uszkodzeń oraz zabezpieczenie przed wtórnymi jego skutkami. W momencie odbioru sygnału informującego o niewystraczającym poziomie wody w podłożu, uruchamiana jest synteza tak zwanych „hormonów alarmowych”. W pierwszej kolejności, gdy stres występuje w mniejszym nasileniu, wytwarzany jest kwas abscysynowy (ABA), a w warunkach silnego stresu – kwas jasmonowy i etylen [Bohnert i in. 1995; Kacperska 2004]. W przypadku suszy, szczególnie ważna jest regulacja ekspresji specyficznych genów, koniecznych w określonych warunkach do produkcji białek, przy jednoczesnej degradacji białek zdenaturowanych. Stres wywołany suszą powoduje także obniżenie potencjału wody, a co za tym idzie, obniżenie zawartości wody w komórce, dehydratację komórek i utratę turgoru. Dochodzi zatem do destabilizacji błony komórkowej, która staje się nieintegralna oraz nieselektywna, a enzymy nieaktywne. Zmniejszenie turgoru wiąże się także z redukcją powierzchni liści, a w konsekwencji ich przedwczesnym starzeniem [Wahid i Rasul 2005]. Kwas abscysynowy, jako cząsteczka sygnałowa jest przesyłany od korzeni do komórek szparkowych, w których następuje otwarcie kanałów dla jonów potasu wypływających do apoplastu. Wraz z „ucieczką” jonów wypływa woda z aparatów szparkowych, co powoduje ich zamknięcie. Prowadzi to do ograniczonej transpiracji i wymiany gazowej dwutlenku węgla i tlenu (Tezara i in. 1999). Zaburzenia działania aparatu fotosyntetycznego powodują generowanie reaktywnych form tlenu (RFT) [Reddy i in. 2004]. Zakłócenie balansu pomiędzy produkcją RFT a wydajnością prawidłowo działającego układu antyoksydacyjnego prowadzi do stresu oksydacyjnego w komórkach oraz peroksydacji białek, lipidów i kwasów nukleinowych [Fu i Huang 2001]. Również dezaktywacja kluczowych enzymów silnie ogranicza fotosyntezę [Bota i in. 2004]. Odwodnienie komórek zwiększa stężenie jonów i lepkość cytoplazmy, skutkujące agregacją i denaturacją białek [Hoekstra i in. 2001]. W wyniku zahamowania asymilacji CO₂, następuje zmniejszona synteza cukrów, co ogranicza energochłonne procesy wzrostu, a w skrajnych przypadkach dochodzi do zahamowania rozwoju generatywnego [Treder i Czynczyk 1997; Singer i in. 2003; Rolbiecki i Rolbiecki 2012; Klamkowski i in. 2013; Rzekanowski i in.

2013]. Skutki działania stresu wodnego uzależnione są od intensywności i czasu jego działania, jak również od stadium rozwojowego oraz uwarunkowań genetycznych rośliny [Plaut 2003; Farooq i in. 2009].

4.7. Rola reduktazy azotanowej w przemianie azotanów

Makro i mikroelementy odgrywają ważną rolę w rozwoju i wzroście roślin. Jednym z pierwiastków, które odgrywają kluczową rolę w plonowaniu roślin, jest azot [Kraiser i in. 2011]. Pierwiastek ten buduje szereg związków organicznych, w tym aminokwasy, białka, koenzymy i kwasy nukleinowe. Wchodzi w skład nukleotydów, które oprócz tworzenia monomerów kwasów nukleinowych odpowiedzialne są za transport energii w postaci ATP i GTP, reszt acylowych oraz elektronów i kationów wodorowych. Ponadto, azot jest składnikiem chlorofilu, cytokinin, cytochromów oraz niektórych witamin [Szymańska 2012].

Azot występuje w wielu formach, ale dla roślin jego źródłem są azotany (V), które pobierane są w postaci jonu NO_3^- , wbudowywanego w związki bioorganiczne dopiero po redukcji do jonu amonowego NH_4^+ . Z tego względu, azotany (V) po pobraniu z gleby muszą być redukowane do azotanów (III) przez obecną w cytoplazmie reduktazę azotanową, a następnie redukowane do jonów amonowych, lub są magazynowane w wakuoli [Sacała i in. 2004]. Rośliny z rodziny bobowatych, mają zdolność nawiązywania symbiozy z bakteriami z rodzaju *Rhizobium*, asymilującymi azot atmosferyczny. Wiązanie wolnego azotu jest procesem wieloetapowym i wymaga nakładu energii, która, tak jak i wodór, powstaje w procesie oddychania (Rys. 3).



Rys. 3. Schemat wiązania wolnego azotu [na podstawie Czerwińskiego (1976)]

Redukcja azotu składa się z dwóch ściśle ze sobą współpracujących układów enzymatycznych:

1. Nitrogenaza aktywuje atomy azotu, odpowiada za łączenie azotu z wodorem, (posiada kofaktory w postaci żelaza i molibdenu).
2. Hydrogenaza przenosi protony wodoru na atomy azotu (posiada kofaktor w postaci żelaza), a ferrodoksyna odpowiada za transport elektronów.

4.8. Rola cukrów w procesach życiowych roślin

Podstawowym źródłem węglowodanów w roślinach jest proces asymilacji dwutlenku węgla w chloroplastach w procesie fotosyntezy. Węglowodany tworzą materiał zapasowy (skrobię i fruktany), stanowią źródło energii na szlakach metabolicznych. Do syntezy ATP wykorzystywana jest glukoza powstała z hydrolizy skrobi, bądź też na innych szlakach przemian metabolicznych. Ryboza i deoksyryboza wchodzi w skład kwasów nukleinowych RNA i DNA. Erytrozo-4-fosforan jest prekursorem kwasu szikimowego, niezbędnego do

syntezy aminokwasów aromatycznych i związków fenolowych. Polisacharydy takie jak celuloza, hemiceluloza czy kwasy pektynowe, pełnią funkcję budulcową ścian komórkowych i blaszki środkowej roślin. Ponadto, cukry łączą się z różnymi metabolitami np. z hormonami, antocyjanami lub alkaloidami, a na powierzchni komórek odgrywają kluczową rolę w procesach transdukcji sygnałów [Augystyniak i in. 1999].

Cukry pełnią ważne i bardzo zróżnicowane funkcje we wzroście i rozwoju roślin. Między innymi regulują gospodarkę wodną, proces kiełkowania nasion, kwitnienia i wypełniania nasion związkami zapasowymi. Inną funkcją cukrów jest osmoregulacja w warunkach stresu abiotycznego i biotycznego [Stitt i Hurry 2002]. Stanowią one zasoby energii, która uwalnia się w czasie procesu oddychania. Stwierdzono również ich udział w regulacji metabolizmu, jako cząsteczki sygnałowe [Stitt i in. 2002, Gib-Son 2005]. Brak cukrów w organizmie roślinnym może wpływać stymulująco na intensywność fotosyntezy, działając na ekspresję genów kontrolujących ten proces [Far i in. 2000, Paul i in. 2001, Ciereszko 2002]. W przypadku zmian w ilości cukrów w komórkach tworzy się sygnał, który odbierany jest przez geny plastydowe i jądrowe [Ciereszko 2002].

4.9. Wykorzystanie metody oznaczenia dyskryminacji izotopów węgla ^{13}C i azotu ^{15}N

Na naszej planecie występują pierwiastki, które są niezbędne do życia roślin i zwierząt. Są to tak zwane pierwiastki biogenne, takie jak azot, węgiel i wodór, które występują w formie izotopów stabilnych lub niestabilnych, czyli radioaktywnych. Izotopy to odmiany tego samego pierwiastka, które w jądrach atomowych zawierają różne liczby neutronów przy stałej liczbie protonów. Węgiel występuje w formie dwóch izotopów trwałych: ^{12}C (6 protonów, 6 neutronów) lub ^{13}C (6 protonów, 7 neutronów), natomiast azot występuje w dwóch formach izotopowych: ^{14}N (7 protonów, 7 neutronów) lub ^{15}N (7 protonów, 8 neutronów). Wszystkie te izotopy powstawały w okresie poprzedzającym tworzenie się Ziemi, przy czym, izotopy trwałe pozostały w niezmienionej formie do czasów obecnych, zaś radioaktywne rozpadały się z charakterystycznym dla nich okresem rozpadu. Na Ziemi izotopy nietrwałe ciągle powstają np. w wyniku oddziaływania promieni kosmicznych. Za nietrwałe uważa się takie, które rozpadają się samorzutnie i przekształcają w izotopy innych pierwiastków, stąd ustaliła się równowaga, w wyniku której w atmosferze ^{15}N stanowi 0.37%, a ^{13}C 0.95% (Tabela 1).

Tabela 1. Udział procentowy izotopów wodoru, węgla i azotu w atmosferze ziemskiej [https://pl.wikipedia.org/wiki/Atmosfera_Ziemi].

Pierwiastek	Formy stabilne (proporcje)	Formy niestabilne
Wodór (H)	^1H (99,94%), ^2H (0,06%)	^3H – tryt
Węgiel (C)	^{12}C (99,05%), ^{13}C (0,95%)	^{14}C
Azot (N)	^{14}N (99,63%) ^{15}N (0,37%)	^{13}N i ^{16}N

Niektóre systemy metaboliczne u roślin i innych organizmów żywych wykazują różnice w szybkości reakcji w zależności od masy atomowej danego izotopu. Przykładowo, węgiel ^{14}C jest cięższy od ^{12}C o 16% , stąd atomy te w formie dwutlenku węgla dyfundują nieco wolniej od lekkich atomów, co wpływa na intensywność fotosyntezy roślin (tzw. efekt izotopowy).

Trwałe izotopy węgla i azotu coraz częściej znajdują zastosowanie w dziedzinach biochemii i fizjologii. Wpływ na to ma postęp w konstrukcji aparatury badawczej, pozwalającej na separację różnych izotopów. Dotyczy to w szczególności izotopów radioaktywnych, ponieważ zastąpienie ich izotopami trwałymi radykalnie poprawiło warunki bezpieczeństwa pracy w laboratoriach badawczych.

W przypadku węgla ^{13}C wykorzystuje się fakt, że enzym karboksylaza-oksigenaza RUBP (rybulozo-bisfosforanu) tj. RuBisCo, (najważniejszy enzym uczestniczący w fotosyntetycznej asymilacji CO_2), w największym stopniu obniża proporcję obu izotopów w produktach fotosyntezy w porównaniu do wzorca, jakim jest atmosferyczny dwutlenek węgla lub skrobia ziemniaczana. Na tej podstawie określa się tak zwany wskaźnik dyskryminacji. Wskaźnik ten ma wartość ujemną, ponieważ zawartość ^{13}C jest w produktach fotosyntezy roślin zwykle mniejsza niż w materiałach wzorcowych. Stąd, im mniejsze są zawartości tego izotopu w porównywanych próbkach, tym mniejsza wartość wskaźnika dyskryminacji (wartość ta w liczbach bezwzględnych jest większa). Wartości współczynnika dyskryminacji zwykle są większe u roślin typu C4 w porównaniu z roślinami typu C3. W suszy, w tkankach coraz mniejsza zawartość izotopu ^{13}C oznacza, że wskaźnik dyskryminacji rośnie (wartość bezwzględna jest mniejsza bowiem wskaźnik dyskryminacji przedstawiony jest jako wartości ujemne). Te pierwsze charakteryzują się bowiem obecnością jeszcze innych karboksylaz, które są bardzo mało wrażliwe na rodzaj izotopu węgla.

W czasie wzrostu roślina jest narażona na okresowy deficyt wody w glebie. W warunkach, gdy szparki są zamknięte, dostępność atmosferycznego dwutlenku węgla zmniejsza się, co powoduje spadek aktywności RuBisCo. Stopień przymknięcia szparek

wpływa więc na stopień „recyklingu” dwutlenku węgla pochodzącego głównie z oddychania. Innymi czynnikami decydującymi o tym procesie może być specyficzna budowa liści (np. liście pokryte włoskami mają mniejszą wentylację), grubość liści oraz liczba i wielkość aparatów szparkowych. Istotna jest również budowa innych organów roślinnych np. obecność kanałów łądogowych np. u bobiku, lub obecność innych pustych komór wewnątrz tych organów, jak u owoców papryki i ogórka lub w strąkach grochu. W tych warunkach bowiem nocą, w wyniku oddychania, dwutlenek węgla gromadzi się w komorach i wówczas jego stężenie może wzrosnąć kilkadziesiąt razy w stosunku do atmosferycznego, co pozwala na przyspieszenie fotosyntezy w ciągu dnia. Zmniejsza się wtedy udział enzymu RuBisCo w stosunku do innych karboksylaz. Mimo niskiego stężenia atmosferycznego CO₂, RuBisCo jest w stanie zachować dużą aktywność [Park i Epstein 1961]. Skutkiem takiej dyskryminacji zmniejsza się stosunek stężeń ¹³C/¹²C w asymilatach organów powstałych w czasie wzrostu roślin, w porównaniu do stosunku tych izotopów w atmosferycznym dwutlenku węgla.

Z kolei, pomiary zawartości azotu ¹⁵N w próbkach roślinnych, pozwalają określić efektywność różnych źródeł azotu wykorzystywanego przez rośliny. Rośliny bobowate wykształciły dwa niezależne mechanizmy przyswajania azotu:

- azot pochodzący z nawozów azotowych,
- azot atmosferyczny wiązany w brodawkach przez bakterie *Rhizobium*.

Obie te formy azotu uzupełniają się w tym sensie, że intensywniejsze wiązanie azotu w brodawkach umożliwia mniejsze korzystanie z nawozów azotowych. Stąd też, u roślin uprawnych, zwłaszcza strączkowych, znajomość udziału azotu pochodzącego z brodawek jest istotnym wskaźnikiem w hodowli nowych odmian tych roślin.

Metoda pomiaru zawartości ¹⁵N polega na dodaniu znanej ilości siarczanu amonu z izotopem ¹⁵N, a następnie po zbiorach analizuje się zawartość tego izotopu w poszczególnych organach roślinnych. Z tych danych można wyliczyć, ile azotu w plonie pochodzi z wiązania azotu w brodawkach. Na potrzeby niniejszej pracy opracowano uproszczoną metodę oznaczania procentowego udziału ¹⁵N, pochodzącego z wiązania przez bakterie brodawkowe.

W tej metodzie trzeba znać wartości graniczne w roślinach wzorcowych. Potrzebne są dwa wzorce (K1 i K2):

- K1 – roślina nienależąca do rodziny bobowatych, uprawiana na glebie wzbogaconej w ¹⁵N. W naszym doświadczeniu uzyskano graniczną wartość 161,0.
- K2 – roślina nienależąca do rodziny bobowatych, rosnąca na glebie bez dodatku ¹⁵N, w eksperymencie uzyskano tę wartość równą 7,67.

Wartości w badanych próbkach powinny zmieścić się zatem w przedziale 7,67 do 161,0. Rośliny bobowate rosnące na glebie wzbogaconej w ^{15}N oraz w obecności nawozu mineralnego miałyby tym większe wartości tego parametru, im mniejszy wskaźnik wiązania azotu biologicznego. Przyjęto, że w doświadczeniu, rośliny strączkowe korzystały z obu mechanizmów przyswajania azotu, co pozwoliło zastosować znany w chemii wzór na obliczenie końcowego stężenia jakiegoś składnika przez zmieszanie dwóch roztworów o różnych stężeniach.

Z tego względu rośliny bobowate są idealnym modelem, który może być wykorzystany do obserwacji typowej dyskryminacji izotopu ^{15}N . Dodając ten izotop do gleby, można odróżnić produkty wytwarzane w procesie korzeniowego pobierania azotu od tych, powstających w wyniku wiązania azotu atmosferycznego. Po zbadaniu pomiaru zawartości ciężkiego izotopu w tkankach roślin można oszacować, w jakiej proporcji biogeny azot powstał w wyniku opisanych mechanizmów pobierania, a tym samym biologiczną efektywność wiązania azotu w roślinach [badania własne w ramach projektu MRiRW „Polskie białko”].

4.10. Ocena wpływu stresów środowiskowych na wzrost i rozwój roślin

Stresy środowiskowe wywołują wiele zaburzeń procesów fizjologicznych i metabolicznych roślin. Najczęściej obserwuje się zahamowanie fotosyntezy (Ashraf i Harris 2013), oraz oddychania (Arnholdt-Schmitt i in. 2006), a także spowolnienie lub zastopowanie wzrostu (Davies i in. 1986; Nadeem i in. 2014; Safdar i in. 2019). Ocenę reakcji rośliny na stres można dokonywać na podstawie zmian zewnętrznych w wyglądzie rośliny tj. w barwie lub w zasychaniu tkanek. Metoda ta jest niedokładna i nieobiektywna. Najczęściej odporność roślin na niekorzystne warunki środowiskowe ocenia się na podstawie przyrostu świeżej i suchej masy. Jest to oczywiście efekt końcowy, kiedy rośliny zbiera się z pola lub z pojemników, w zależności od układu doświadczalnego. Dla rolnika/ogrodnika plon jest najbardziej pożądanym efektem uprawy roślin. Nie uwzględnia on jednak zmian zachodzących bezpośrednio po wystąpieniu stresu. W ostatnich latach zwraca się szczególną uwagę na prognozowanie plonów na podstawie zmian zachodzących w roślinach na poziomie tkanki, komórki i molekularnym (He i in. 2002; Kalaji i in. 2018; Płażek i in. 2018; Rashid i Xia 2019). Analizując procesy zachodzące na tych poziomach, poszukiwane są markery odporności roślin na dany stres. Wiele metod takich jak analizy laboratoryjne są bardzo kosztowne i pracochłonne. Wszystko to spowodowało, że obecnie najlepszą opcją badania

stanu fizjologicznego roślin jest aparatura elektroniczna. Urządzenia te umożliwiają wykonanie szybkich analiz, nie uszkadzając przy tym tkanek roślinnych, zachowując naturalne środowisko wzrostu roślin. Poniżej omówiono możliwości pomiarów natężenia stresu analizą fluorescencji chlorofilu *a* oraz aktywności antyoksydacyjnej, uruchamianej w roślinie w wyniku działania praktycznie wszystkich stresów abiotycznych i biotycznych.

4.10.1. Określanie stanu fizjologicznego roślin metodą pomiaru fluorescencji chlorofilu

Popularnym urządzeniem wykorzystywanym w badaniu wpływu środowiska na roślinę jest fluorometr, który rejestruje reemisję energii świetlnej pochłanianą przez anteny energetyczne aparatu fotosyntetycznego. Dzięki tej metodzie można zbadać zmiany zachodzące w procesie fluorescencji u wszystkich organizmów przeprowadzających proces fotosyntezy [Center i in. 2016].

Pomiar fluorescencji chlorofilu jest metodą bardzo czułą, wiarygodną i można ją przeprowadzić w każdym miejscu [Kalaji i in. 2014b]. Podstawą pomiaru jest spektrometria emisyjna – ocena widma emitowanego spontanicznie lub po dostarczeniu określonego bodźca [Murkowski 2002]. Energia promieniowania słonecznego stanowi siłę napędową głównego procesu biochemicznego roślin. Rośliny wykorzystują promieniowanie fotosyntetycznie czynne (ang. *photosynthetic active radiation* – PAR), czyli światło w zakresie od 400 do 700 nm. Organizmy zdolne do fotosyntezy zawierają chlorofil *a*, pełniący kluczową rolę w tym procesie [Strzałka 2012]. Częsteczkę chlorofilu budują pierścienie feoporfiryny i reszty fitolu, połączonego z resztą kwasu propionowego za pomocą wiązania estrowego. Za absorpcję promieniowania świetlnego odpowiadają wiązania sprzężone pierścieni pirolowych. Błona tylakoidu, która jest miejscem przebiegu fazy jasnej fotosyntezy u roślin, zawiera dwa kompleksy białkowo-barwnikowe tj. fotosystem I (PSI) i fotosystem II (PSII) oraz kompleks cytochromowy i syntazę ATP. Częsteczki barwników asymilacyjnych w fotosystemach absorbują energię świetlną. Wzbudzenie cząsteczek barwników w systemach antenowych PSII oraz bezpośrednio pochłonięcie fotonów przez centra reakcji (ang. *reaction center* – RC) wytwarza energię niezbędną do wzbudzenia cząsteczek chlorofilu [Govindjee 2004]. Rośliny wykształciły anteny zewnętrzne, które zbierają energię świetlną: LHC I (Light-harvesting complexes I) w fotosystemie I i LHC II (Light-harvesting complexes II) w drugim fotosystemie. Anteny wewnętrzne natomiast, razem z centrami reakcji tworzą kompleksy antenowe [Kouril i in. 2005]. Po zaabsorbowaniu energii przez cząsteczki chlorofilu, jest ona kilkakrotnie transformowana, a następnie przekształcana w energię chemiczną

wykorzystywaną w dalszych procesach życiowych. Wskutek powrotu elektronów z cząsteczek barwników, które zostały wzbudzone przez fotony światła do poziomu podstawowego, powstaje fluorescencja chlorofilu.

Popularną metodą zbadania wydajności fotosyntetycznej PSII jest metoda pomiaru fluorescencji chlorofilu *a*, którą można wykorzystać w naturalnym środowisku rośliny, gdzie narażona jest na działanie stresów [Rosenqvist i van Kooten 2003]. W zależności od natężenia i czasu trwania stresu fluorescencja ulega różnym modyfikacjom. Analizując wyniki parametrów fluorescencji, można wykryć zmiany zachodzące w roślinach, jeszcze zanim pojawią się widoczne symptomy wpływu oddziaływania czynnika stresowego na roślinę [Lichtenthaler 2007]. Badanie to nie jest w stanie określić, jaki stres oddziałuje na roślinę, ale dzięki niemu można ocenić ogólną kondycję roślin [Baker i Rosenquist 2004, Kalajii i Guo 2008].

4.10.2. Ocena natężenia stresu antyoksydacyjnego

Zachwianie równowagi pomiędzy reaktywnymi formami tlenu (RFT), a możliwością organizmu do ich zwalczania, nazywane jest stresem oksydacyjnym (Wojtaszek 1997; Mittler 2002; Vranová i in. 2002). Reaktywne formy tlenu są wytwarzane w organizmach żywych pod wpływem różnych czynników zewnętrznych, stresów abiotycznych i biotycznych. Do czynników tych zaliczane są praktycznie wszystkie stresy środowiskowe, przykładowo: zasolenie gleby, susza, zalewanie, zanieczyszczenie jonami metali ciężkich, mróz, szok cieplny, promieniowanie UV czy atak patogenów. Reaktywne formy tlenu powstają zazwyczaj w trakcie naturalnie przebiegających fizjologicznych i biochemicznych procesów w komórce (mówi się wtedy o fizjologicznym stężeniu RFT) oraz w czasie reakcji odpornościowej roślin na dany stres [Sheu i in. 2006]. Wolne rodniki mogą wpływać destrukcyjnie na strukturę komórek i związków organicznych, a ich nadmiar prowadzi do śmierci pojedynczych komórek lub całego organizmu [Ahmadi i in. 2008]. Z drugiej strony, RFT pełnią istotne funkcje, na przykład są ważnym ogniwem w transdukcji sygnałów uruchamianej w ramach odpowiedzi na stres [Breusegemi in. 2008]. Regulacja stężenia RFT zależy od warunków środowiska, etapu rozwoju, tkanki oraz typu komórek i jest kluczowa dla prawidłowego funkcjonowania roślin [Gechevi i in. 2006]. W wyniku procesów ewolucyjnych rośliny wykształciły mechanizmy regulujące stężenie tych związków i chroniące rośliny przed ich szkodliwym działaniem. Ponadto, istnieje możliwość izolacji

miejsce, w których wytwarzane są RFT poprzez odpowiednią organizację strukturalną komórek oraz tkanek [Halliwell 2000].

W odpowiedzi na pojawienie się RFT aktywowane są enzymatyczne i nieenzymatyczne przeciwutleniacze. Do enzymów antyoksydacyjnych zaliczane są: dysmutaza anionorodnika ponadtlenkowego (SOD), katalaza (CAT) i peroksydazy (POX, oznaczenie peroksydazy niespecyficycznej tj. puli peroksydaz). Dysmutaza anionorodnika ponadtlenkowego odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu równowagi redox i odpowiedzi obronnej w roślinach narażonych na stres. Zadaniem SOD jest katalizowanie dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) i rodnika wodoronadtlenkowego (HO_2^{\cdot}) do nadtlenu wodoru (H_2O_2) i H_2O . Dysmutaza anionorodnika ponadtlenkowego jest pierwszą linią obrony przed atakiem patogenów i chroni rośliny przed stresem oksydacyjnym [Wang 2016].

Katalaza rozkłada H_2O_2 do H_2O i O_2 oraz reguluje stężenie H_2O_2 w tkankach roślinnych. Bierze także udział w rozwoju roślin oraz odgrywa ważną rolę w odporności roślin na patogeny i procesy starzenia [Yang 2002; Nazir i in. 2020].

Peroksydazy pełnią podobną funkcję do katalazy, ponieważ odpowiedzialne są za rozkład nadtlenu wodoru w interakcji pomiędzy patogenem a rośliną. Warto jednak zaznaczyć, że peroksydazy są aktywowane przy dużo mniejszych stężeniach H_2O_2 (μmol) w porównaniu do katalazy, która jest aktywowana przy milimolowych stężeniach [Mittler 2002]. Ponadto, niektóre peroksydazy są odpowiedzialne za utlenianie fenoli, czyniąc je bardziej toksycznymi wobec patogenów, biorą udział w syntezie ligniny, w procesach korkowacenia i wzrostu ścian komórkowych roślin [Madadkhah 2012].

Nadtlenek wodoru odgrywa istotną rolę jako cząsteczka sygnałowa. Inicjuje szlak fenolowy poprzez aktywację amoniakolizazy fenyloalaniny (PAL), bierze udział w otwieraniu i zamykaniu aparatów szparkowych, dzięki niemu powstają mostki wodorowe pomiędzy łańcuchami poligalakturonowymi i hydrokysproliną, przez co następuje wzmocnienie ściany komórkowej, aktywuje białka i czynniki transkrypcyjne [Wojtaszek 1997; Mittler 2002; Vranová i in. 2002]. Dzięki swoim właściwościom przeciwdrobnoustrojowym H_2O_2 może wywoływać miejscową i ogólnoustrojową odporność roślin na infekcje patogenami [Gechev 2005].

Biorąc pod uwagę powyższe informacje, do oceny natężenia stresu oksydacyjnego, stopnia uszkodzeń wywołanych przez RFT i zdolności rośliny do obrony przed danym stresem wykorzystywane są metody analityczne, określające głównie aktywność enzymów antyoksydacyjnych. Do najczęściej mierzonych należą aktywności SOD, KAT i POX. Ponadto, przy uszkodzeniach wywołanych zasoleniem, czy jonami metali ciężkich

analizowany jest stopień utlenienia lipidów błon cytoplazmatycznych (poziom dialdehydu malonowego) (Liang i in, 2018) lub aktywność enzymów i poziom niskocząsteczkowych związków wchodzących w skład cyklu askorbinianowo-glutationowego (Semane i in. 2007).

5. Materiał i metody

5.1. Materiał nasienny

Doświadczenia prowadzono na czterech odmianach soi uprawnej: „Abelina”, „Malaga”, „Merlin” oraz „Petrina”. Nasiona pierwszych trzech odmian pochodziły z firmy Saatbau Polska Sp. z o.o. , natomiast odmiana „Petrina” z firmy *DANKO* Hodowla Roślin Sp. z o.o. w Choryni. Nie w każdym eksperymencie wykorzystywano wszystkie odmiany. Wybór odmian zależał od celu doświadczenia i dostępności nasion w danym roku prowadzenia badań.

5.2. Układ doświadczeń

Doświadczenie 1. Wpływ terminu siewu soi uprawnej na plonowanie

Celem doświadczenia było sprawdzenie wpływu terminu siewu nasion, szczepionek bakteryjnych oraz przykrycie agrowłókniną na plonowanie soi uprawnej. Doświadczenie prowadzono w latach 2018-2020 na poletkach (2 m x 1 m) Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie (50° 04' 10" N, 19° 50' 44" E). Nasiona wysiewano w dwóch rzędach, po przerwaniu roślin w jednym rzędzie rosło 50 roślin (Fot.1). Na zdjęciu widać różną wysokość roślin wysiewanych w kolejnych terminach (Tabela 2).



Fot 2. Uprawa poletkowa soi zwyczajnej wysiewanej w różnych terminach
[autor: A. Szczerba]

Doświadczenie 1A. Wpływ terminu siewu i szczepionek bakteryjnych na plonowanie soi uprawnej odmiany „Petrina”

W 2018 roku nasiona odmiany „Petrina” wysiano w kombinacjach przedstawionych w Tabeli 2.

Tabela 2. Terminy siewu i zbioru oraz warianty zastosowania szczepionki bakteryjnej w uprawie odmiany „Petrina” w doświadczeniu 1A.

Obiekt	Termin siewu	Termin zbioru
I	12.04.	31.08.
II	4.05.	3.09.
III	21.05.	13.09.
IV A	5.06.	25.09.
IV B	5.06.	25.09.
V A	25.06.	15.10.
V B	25.06.	15.10.
VI	12.07.	16.10.
VII	27.07.	27.10.
VIII	29.08.	brak rozwoju

A – brak szczepionki; B – Nitragina IUNG

W dniu podanego terminu zbioru wybierano nasiona z losowo wybranych 20 roślin. Analizowano następujące parametry plonowania: liczbę dojrzałych strąków, liczbę dojrzałych nasion w strąku w przeliczeniu na jedną roślinę, masę nasion na roślinę oraz masę tysiąca nasion (MTN).

Doświadczenie 1B. Wpływ terminu siewu i zastosowania agrowłókniny w okresie kiełkowania na plonowanie soi uprawnej odmiany „Abelina”, „Merlin” i „Petrina”

W 2019 roku doświadczenie prowadzono na następujących odmianach soi: „Abelina”, „Merlin” i „Petrina”, które wysiewano na poletkach podobnie, jak w poprzednim roku. W pierwszym terminie (9. kwietnia) część nasion przykrywano agrowłókniną (Tabela 3). Agrowłóknina była ściągana po miesiącu od daty siewu (w fazie drugiego liścia), co było związane z przebiegiem temperatury w tym okresie. Plon analizowano w taki sam sposób, jak opisano w doświadczeniu 1A w 2018 roku.

Tabela 3. Termin siewu i zbioru oraz warianty stosowania agrowłókniny w uprawie odmian: „Abelina”; „Merlin”; „Petrina” w doświadczeniu 1B.

Obiekt	Termin siewu	Termin zbioru
I termin	9.04.	30.08.
I termin + agrowłóknina	9.04.	30.08.
II termin	20.05.	13.09.
III termin	19.08.	brak zbioru

Doświadczenie 1C. Wpływ terminu siewu na plonowanie soi uprawnej odmiany „Abelina”, „Merlin” i „Petrina”

W 2020 roku doświadczenie prowadzono na odmianach soi: „Abelina”, „Merlin”, „Petrina”, które zostały wysiane, przykryte agrowłókniną na okres około jednego miesiąca w terminach jak podano w Tabeli 4. Nasiona zebrano i analizowano plon tak, jak opisano w doświadczeniu 1A w 2018 roku.

Tabela 4. Terminu siewu i zbioru oraz warianty stosowania agrowłókniny w uprawie odmian: „Abelina”, „Merlin”, „Petrina”.

Obiekt	Termin siewu	Termin zbioru
I	22.04.2020	10.07.2020
II	2.06.2020	2.09.2020

Doświadczenie 2. Wpływ biostymulatorów na plonowanie soi uprawnej

Celem doświadczenia było zbadanie wpływu takich preparatów stymulujących, jak ASAHI SL, rozpuszczalny krzem, metanol oraz zearalenon (ZEN) na plon nasion. Nasiona wysiewano tak samo, jak opisano w doświadczeniu pierwszym. Substancje stymulujące podawano w formie oprysków po 300 ml roztworu na obiekt (100 roślin), w początkowej fazie kwitnienia. Zastosowano następujące stężenia preparatów: ASAHI SL – $1 \text{ cm}^3 \text{ dm}^{-3}$ rozpuszczalny krzem (Na_2SiO_3) – $1,775 \text{ g dm}^{-3}$ oraz 12% metanol, ZEN – 1mg/ml. Rośliny kontrolne opryskiwano wodą destylowaną. Zbioru nasion dokonano z losowo wybranych 20 roślin z każdego obiektu, a następnie wykonano analizę elementów plonu, jak opisano w doświadczeniu pierwszym.

Doświadczenie 2A. Plonowanie soi uprawnej odmiany „Petrina” pod wpływem biostymulatorów

W 2019 roku doświadczenie prowadzono na odmianie „Petrina”. Doświadczenie założono 9. kwietnia, a zbiór nasion nastąpił 30. sierpnia. Oprysk wykonano w fazie początkowego kwitnienia 14. czerwca.

Doświadczenie 2B. Analiza profilu hormonalnego w liściach soi oraz plonowania odmian „Abelina” oraz „Merlin” pod wpływem biostymulatorów

W roku 2020 doświadczenie prowadzono na odmianach soi „Abelina” oraz „Merlin”, które wysiano na poletkach 22. kwietnia. Oprysk biostymulatorami wykonano 4. czerwca, gdy rośliny rozpoczynały kwitnienie. W fazie kwitnienia zebrano próbki (w trzech terminach w odstępach tygodniowych) w celu analizy profilu hormonalnego w liściach. Zbiór nasion nastąpił 24. sierpnia.

Doświadczenie 3. Wpływ szczepionek bakteryjnych na plonowanie soi

Celem doświadczenia było zbadanie wpływu szczepionek bakteryjnych (*Bradyrhizobium japonicum*) pochodzących od różnych producentów na wytwarzanie brodawek korzeniowych oraz plonowanie nasion soi, także w warunkach suszy glebowej. Doświadczenie zostało przeprowadzone w otwartym tunelu foliowym (50° 04' 10" N, 19° 50' 44" E) w wazonach wypełnionych ziemią uniwersalną (Eko-ziem, pH=6) wymieszaną z ziemią (zdegradowany czarnoziem, utworzony z lessu, I klasa bonitacji gleby) z terenu stacji doświadczalnej UR w Prusach w stosunku 1:1. Przed wysianiem nasion sprawdzono zawartość azotu w użytym podłożu i wynosiła ona $0,133 \pm 0,001 \text{ g kg}^{-3}$ gleby. W trakcie wegetacji rośliny zasilano co dwa tygodnie nawozem mineralnym firmy Florovit. Doświadczenie prowadzono w latach 2018-2020 w różnych wariantach (Fot. 2).



Fot. 2. Uprawa soi zwyczajnej w warunkach otwartego tunelu foliowego [autor:A.Szczerba]

Doświadczenie 3A. Analiza fizjologicznych i biochemicznych parametrów w roślinach odmiany „Petrina” pod wpływem szczepionek bakteryjnych

W tym doświadczeniu zbadano wpływ szczepionek bakteryjnych na parametry kinetyki fluorescencji chlorofilu *a*, zawartość białka ogólnego, aktywność reduktazy azotanowej, stosunek poboru azotu z powietrza do azotu pobieranego z gleby oraz na parametry plonu nasion soi.

W 2018 roku badano stopień pobierania azotu z podłoża i z powietrza przez rośliny soi odmiany „Petrina” inokulowanych szczepionkami od różnych producentów. Doświadczenie założono 6. czerwca. Nasiona inokulowano następującymi szczepionkami baterijnymi: Nitragina IUNG (produkowana w Instytucie Uprawy i Nawożenia Gleb w Puławach), Nitragina Biofood sp. z o.o. z Wałcza oraz Nitraza z Gospodarstwa Badawczo Rozwojowego z Poznania. Jako kontrolę użyto nasion zwilżonych wodą w takiej samej ilości, jaka była zastosowana do rozcieńczenia szczepionek. W początkowym okresie rozwoju pąków kwiatowych, do wazonów dodano jednakową objętość (60 cm^3) roztworu siarczanu amonowego $[(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, zawierającego 10% izotopu ^{15}N (CIL – Cambridge Isotope Laboratory, Wielka Brytania). Przygotowano 0,01% roztwór tego związku. Kontrolę stanowiły rośliny soi rosnące w podłożu bez dodatku izotopu oraz rośliny pochodzące z rodziny innej niż bobowate – rukola (*Brassicaceae*). Nasiona rukoli otrzymano w firmy POLAN sp. z o.o. W czasie kwitnienia zmierzono kinetykę fluorescencji chlorofilu *a*. Następnie zebrano liście, w których wykonano następujące analizy chemiczne: zawartość białka ogólnego, aktywność reduktazy azotanowej w liściach. W próbkach liści i nasion określono stosunek poboru azotu z powietrza do azotu pobieranego z gleby. W fazie formowania strąków zmierzono wysokość roślin, świeżą i suchą masę poszczególnych obiektów. Dojrzałe strąki zebrano w terminie 28. września i dokonano analizy parametrów plonu, jak w doświadczeniu pierwszym. Po wykopaniu roślin analizowano liczbę brodawek wytworzonych na korzeniach w przeliczeniu na jedną roślinę. Metodykę oznaczania udziału azotu pobieranego z powietrza w stosunku do azotu pobieranego z gleby szczegółowo opisano w rozdziale 5.3.

Doświadczenie 3B. Łagodzące działanie szczepionek bakteryjnych na rośliny odmiany „Malaga”, „Merlin” i „Petrina” w warunkach suszy

Badano wpływ zastosowanych szczepionek bakteryjnych na plonowanie soi w warunkach suszy glebowej. Doświadczenie prowadzono w 2019 r. w takich samych warunkach uprawy, jak opisano w doświadczeniu 3A. Nasiona odmian: „Malaga”, „Merlin” i „Petrina” inokulowano szczepionkami baterijnymi: Nitragina IUNG (produkowana w Instytucie Uprawy i Nawożenia Gleb w Puławach), Nitragina Biofood sp. z o.o. z Wałcza, Nitroflora Mycoflor z Laboratorium Grzybów Mikoryzowych z Końskowoli, *Rhizobium* Bio-Gen z Namysłowa oraz HiStick® Soy BASF Agricultural Solutions z Warszawy, a jako

kontrolę wykorzystano nasiona zwilżone wodą w takiej samej ilości, jaka była użyta w czasie rozrabiania szczepionek (Tabela 5).

Tabela 5. Schemat doświadczenia 3B.

Wariant	Kontrola (bez szczepionki)	Szczepionka	Szczepionka + susza	Susza
Optymalne nawadnianie	+	–	–	+
Susza	+	+	+	–
Szczepionka	+	–	+	+

Suszę rozpoczęto w fazie kwitnienia i trwała ona przez 3 tygodnie. Rośliny traktowane suszą podlewano do 20% ppw (pełnej pojemności wodnej), zaś rośliny kontrolne do 70% ppw. Po upływie trzech tygodni suszy wszystkie rośliny podlewano do 70% ppw. Po zakończeniu suszy zmierzono kinetykę fluorescencji chlorofilu *a* w liściach z drugiego międzywęźla od szczytu pędu. W tych liściach wykonano również następujące analizy: aktywność enzymów antyoksydacyjnych (dysmutazy anionorodnika ponadtlenkowego, katalazy, peroksydazy niespecyficznej), poziom nadtlenku wodoru, aktywność reduktazy azotanowej oraz zawartość białka ogólnego. W końcowej fazie wzrostu wykonano pomiary wysokości roślin oraz wyznaczono suchą i świeżą masę części nadziemnych. Pomiary te wykonano na 20 losowo wybranych roślinach. Następnie analizowano parametry plonu: liczbę dojrzałych strąków, liczbę dojrzałych nasion w strąku w przeliczeniu na jedną roślinę, masę nasion z jednej rośliny oraz masę tysiąca nasion (MTN). Rośliny wykopano i policzono brodawki korzeniowe.

Doświadczenie 3 C. Analizy izotopowe węgla ^{13}C i azotu ^{15}N w roślinach odmiany „Petrina” w warunkach suszy

Doświadczenie prowadzono w 2020 roku. Analizowano dyskryminację izotopu ^{13}C i udział azotu ^{15}N w roślinach odmiany „Petrina” w warunkach suszy. Celem doświadczenia było sprawdzenie, jak susza wpływa na „recykling” dwutlenku węgla zachodzący przy przymkniętych aparatach szparkowych w warunkach suszy oraz udział azotu asymilowanego z powietrza w stosunku do azotu pobieranego z gleby. Doświadczenie to prowadzono w warunkach wazonowych w tunelu otwartym. Wazony wypełniano ziemią uniwersalną (Eko-ziem, pH 6) wymieszaną z ziemią z terenu stacji doświadczalnej UR w Prusach

w stosunku 1:1. Nasiona odmiany „Petrina” przed wysiewem inokulowano szczepionką bakteryjną *Bradyrhizobium Nitragina* Biofood. Warunki suszy wprowadzono podlewając rośliny do 20% ppw. Pod koniec wegetacji pobierano próbki liści, strąków i nasion na zawartość izotopu ^{13}C i ^{15}N . W celu oznaczenia izotopu ^{15}N w stosunku do izotopu ^{14}N , do gleby w wazonach dodawano izotop ^{15}N , jak opisano w doświadczeniu 3B. W doświadczeniu tym zastosowano analizę dyskryminacji węgla ^{13}C w roślinach kontrolnych (70% ppw) przed wprowadzeniem suszy (K1) i po zakończeniu suszy (K2). W przypadku oznaczania udziału azotu pobieranego przez korzenie w stosunku do azotu pobieranego z powietrza, kontrola K1 oznacza udział procentowy azotu ^{15}N u roślin nie należących do bobowatych (rukola) i K2 udział ^{15}N w roślinach rukoli rosnących na glebie bez dodatku izotopu ^{15}N .

Doświadczenie 4. Ekspresja genów *NOD* w zależności od zastosowanej szczepionki bakteryjnej

Celem doświadczenia było zbadanie ekspresji genów *Nod* (*NOD21*, *NIC1*, *NORKb*) warunkujących powstawanie brodawek korzeniowych soi uprawianej w obecności różnych szczepionek bakteryjnych. Doświadczenie przeprowadzono w klimatyzowanej szklarni w wazonach o pojemności 4 dm³ wypełnionych wysterylizowanym perlitem. W każdym wazonie rosły dwie rośliny. Rośliny uprawiano w okresie od 15 lipca do 1 października 2020 na świetle dziennym (50° 04' 10" N, 19° 50' 44" E). Temperatura w ciągu dnia wahała się od 22 °C do 26 °C, a nocą od 19°C do 22°C. Nasiona odmiany „Malaga” inokulowano szczepionkami bakteryjnymi: Nitragina IUNG (produkowana w Instytucie Uprawy i Nawożenia Gleb w Puławach), Nitragina Biofood sp. z o.o. z Wałcza, Nitroflora Mycoflor z Laboratorium Grzybów Mikoryzowych z Końskowoli, *Rhizobium* Bio-Gen z Namysłowa oraz HiStick® Soy BASF Agricultural Solutions z Warszawy. Przed wysianiem nasion perlit nawadniono uniwersalnym nawozem ogrodniczym Azofoska firmy INCO S.A (azot azotanowy 5,5%, azot amonowy 8,1%). W czasie rozwoju, rośliny codziennie podlewano 250 cm³ roztworu wodnego z dodatkiem komercyjnego płynnego nawozu mineralnego Florovit firmy INCO S.A. (azot amidowy 2,3%, azot azotanowy 0,7%) w stosunku 40 cm³ : 10 dm³ wody. Materiał do analizy ekspresji genów *Nod* pobrano z korzeni po zakończeniu kwitnienia.

Szczepionki bakteryjne

W doświadczeniu użyto szczepionki bakteryjne, których koncentracja według producenta wynosiła 10^9 CFU/1g. Preparaty różniły się pod względem nośników użytych do ich produkcji, co zostało podane niżej (Tabela 6).

Tabela 6. Szczepionki bakteryjne wykorzystane w doświadczeniach.

Nitragina IUNG	Nitragina Biofood	Nitraza	Nitroflora Mycoflor	Rhizobium Bio-Gen	HiStick® Soy
podłoże perlitowe	podłoże węglowe	zawiesina płynna	zawiesina płynna	liofilizowany szczep bakterii	podłoże węglowe

5.3. Analizy

5.3.1. Analiza warunków meteorologicznych

Przebieg temperatur i opadów rocznych w poszczególnych miesiącach wegetacji, w których prowadzono doświadczenia, analizowano na podstawie danych meteorologicznych uzyskanych z IMGW-PIB oraz OGIMET. Na ich podstawie wyliczono współczynnik hydrotermiczny Sielianinowa (HTC) w postaci: $k = P/0,1 \sum t$, gdzie: P – suma miesięczna opadów atmosferycznych w mm, $\sum t$ – miesięczna suma temperatur powietrza $> 0^{\circ}\text{C}$.

Miesięczne sumy temperatury otrzymano mnożąc średnią miesięczną temperaturę powietrza przez liczbę dni w miesiącu. W pracy wykorzystano podział na 10 klas wartości współczynnika k, umożliwiającą wyodrębnienie zarówno warunków ekstremalnie suchych, jak i ekstremalnie wilgotnych. Były to następujące przedziały wartości:

- Skrajnie suchy (ss) $k \leq 0,4$
- Bardzo suchy (bs) $0,4 < k \leq 0,7$
- Suchy (s) $0,7 < k \leq 1,0$

- Dość suchy (ds) $1,0 < k \leq 1,3$
- Optymalny (o) $1,3 < k \leq 1,6$
- Dość wilgotny (dw) $1,6 < k \leq 2,0$
- Wilgotny (w) $2,0 < k \leq 2,5$
- Bardzo wilgotny (bw) $2,5 < k \leq 3,0$
- Skrajnie wilgotny (sw) $k > 3,0$

Za warunki ekstremalne przyjęto takie wartości k , które mieszczą się w przedziałach niższych od 0,7, a więc warunki skrajnie suche i bardzo suche oraz wartości powyżej 2,5 jako warunki bardzo wilgotne i skrajnie wilgotne [Skowera i Puła 2000].

5.3.2. Wyznaczanie pojemności wodnej gleby w warunkach suszy

Warunki suszy uzyskano przez doprowadzenie do 20% (doświadczenie 3B i C) ppw (połowej pojemności wodnej) gleby w wazonach. Rośliny kontrolne rosły w warunkach 70% ppw. Pojemność wodną wyznaczano metodą wagową. Wazony o jednakowej pojemności wypełniano glebą do ustalonej wagi, następnie zanurzano je w wodzie do uzyskania 100% ppw i ponownie ważono. Wazony z glebą o 100% ppw suszono w 70°C przez 48 godzin do uzyskania 0% ppw i ponownie ważono. Na podstawie różnicy mas wazonów ze 100% ppw i 0% ppw wyznaczono masę wody wymaganej do uzyskania odpowiednio 20% i 70% ppw.

5.3.3. Analiza świeżej i suchej masy oraz parametrów plonu

Część nadziemną roślin ścinano i ważono wyznaczając świeżą masę (ś.m.), następnie suszono przez 48 godzin w temperaturze 70°C w celu oznaczenia suchej masy (s.m.). Parametry plonu analizowano na losowo wybranych 20 roślinach po zakończeniu wegetacji. Analiza obejmowała: liczbę dojrzałych strąków, liczbę nasion w strąku, masę nasion w przeliczeniu na jedną roślinę oraz masę tysiąca nasion (MTN).

5.3.4. Określenie liczby brodawek na korzeniach

Liczbę brodawek analizowano na roślinach traktowanych czterema szczepionkami bakteryjnymi, jak opisano w doświadczeniu 3B. Analizę wykonano po zakończeniu wegetacji na 20 losowo wybranych roślinach inokulowanych każdą szczepionką osobno. Rośliny

delikatnie wyciągano z wazonów, korzenie płukano w wodzie i wykładano na bibułę filtracyjną, a następnie zliczano brodawki w obrębie całego systemu korzeniowego.

5.3.5. Oznaczanie azotu w glebie

Zawartość azotu w glebie używanej do doświadczenia 3A i 3B, którego celem było określenie udziału azotu pobieranego przez rośliny z gleby i z powietrza oraz dyskryminacji izotopu ^{13}C oznaczono w Katedrze Gleboznawstwa i Agrofizyki Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Analizę przeprowadzono za pomocą analizatora VarioMAX CN zgodnie z normą DIN / ISO 10694 (<https://www.kendrolab.pl/files/1487111989/oznaczanie-wegla-organicznego-w.pdf>).

Zawartość azotu podano w miligramach na kilogram suchej masy gleby.

5.3.6. Oznaczenie zawartości białek rozpuszczalnych w liściach

Zawartość białek rozpuszczalnych w liściach wykonano metodą Bradford (1976). Wymagany odczynnik sporządzono w następujący sposób: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Fluka, Polska) rozpuszczono w 50 cm³ etanolu 96%, następnie dodano 100 cm³ kwasu ortofosforowego (POCH, Polska) i dopełniono wodą destylowaną do 1000 cm³. Roztwór przesączono przez miękką bibułę filtracyjną do butelki ze szkła oranżowego i przechowywano w lodówce w 8 °C. Przed każdym użyciem roztwór ogrzewano do temperatury pokojowej i filtrowano przez sączki nr 390 (Munktell i Filtrak, Niemcy). Próbkę 20-30 mg zmielonych liści zalewano 5 cm³ wody destylowanej i wytrząsano przez 1 godzinę na wytrząsarce. Następnie próbki odwirowano przez 10 min. przy 4000 × g. Do analizy pobrano 0,008-0,015 cm³ supernatantu, który mieszano w kuwecie pomiarowej z 0,93 cm³ roztworu Bradford i dopełniano wodą tak, aby sumaryczna objętość wynosiła 1 cm³. Odczytu absorbancji dokonano na spektrofotometrze Bio-Lambda Perkin-Elmer (USA) po 20 min inkubacji przy długości fali 595 nm. Do przygotowania krzywej kalibracyjnej używano albuminy wołowej BSA (Sigma-Aldrich, Polska) o stężeniu 0,5–1 mg cm⁻³ wody destylowanej. Analizy wykonano na 20 roślinach z każdego wariantu (odmiana x szczepionka).

5.3.7. Pomiar względnej zawartości wody (RWC)

Pomiar wykonywano w 10 powtórzeniach dla każdego obiektu. Zebraną część naziemną rośliny ważono w celu wyznaczenia świeżej masy (ś.m.), po czym umieszczano na 48 godzin w suszarce w temperaturze 70°C i ponownie ważono w celu wyznaczenia suchej masy (s.m.). Względną zawartość wody obliczano według wzoru:

$$RWC = \frac{\text{ś.m.} - \text{s.m.}}{\text{ś.m.}} \times 100\%$$

5.3.8. Pomiar kinetyki fluorescencji chlorofilu *a*

Fluorescencję chlorofilu *a* mierzono na trzecim od góry dobrze rozwiniętym liściu, przy pomocy aparatu Plant Efficiency Analyzer PEA (Hansatech Ltd. Kings Lynn, UK). Przed rozpoczęciem pomiarów układ oświetlający fluorymetru, złożony z czerwonych lamp LED był kalibrowany światłomierzem SQS (Hansatech Ltd. Kings Lynn). Natężenie promieniowania wysycającego chlorofil wynosiło 3 mmol m⁻² s⁻¹ (650 nm). Pomiarów wykonano po 30 min adaptacji strefy pomiaru liści do ciemności (na liście zakładano klipsy z otworem o średnicy 4 mm, które otwierano przed rozpoczęciem pomiaru). Parametry fluorescencji zostały zmierzone przy pomocy fotodiod PIN po przejściu promieniowania przez filtr odcinający fale krótkie. Zmiany fluorescencji były rejestrowane co 10 μs przez 1 s. W czasie pierwszych 2 ms dane były zapamiętywane co 10 μs z rozdzielczością 12 bitów. Na podstawie tych pomiarów określono główne wartości parametrów fluorescencji:

- F_v/F_m – maksymalna wydajność fotochemiczna PSII;
- ABS/CS_m – absorpcja energii przechwytywanej przez centra reakcji w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię fotosyntetyzującej próbki;
- TR_o/CS_m – strumień przechwytywanej energii w wyniku redukcji plastochinonu w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię fotosyntetyzującej próbki;
- ET_o/CS_m – strumień energii transportowanej poza Q_A w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię fotosyntetyzującej próbki;
- DI_o/CS_m – wielkość rozproszenia energii w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię fotosyntetyzującej próbki;
- RC/CS_m – zagęszczenie aktywnych centrów reakcji PSII redukujących plastochinon Q_A w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię fotosyntetyzującej próbki;
- PI – wartość wskaźnika funkcjonowania PSII

Dane powyższe obliczono na podstawie teorii przepływu strumieni energii przez PSII przy pomocy tzw. testu JIP [Srivastava i Straserr 1977; Strasser i Strasser 1995; Lazár 1999; Lazár i Pospíšil 1999; Strasser i in. 2000]. Pomiary wykonano w 10 powtórzeniach (na 10 roślinach) z każdego obiektu.

5.3.9. Analiza fitohormonów metodą HPLC

Analizy fitohormonów wykonano przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (*ang. high performance liquid chromatography*) ze spektrometrii masową. Analizy wykonano w trzecim od góry dobrze rozwiniętym liściu. Próbkę zliofilizowano i zhomogenizowano, a następnie przygotowano naważki (30 mg). Badane substancje ekstrahowano mieszaniną metanolu, wody i kwasu mrówkowego w stosunku 15 : 4 : 1 (v:v:v). Po odwirowaniu zebrano supernatant i nałożono na kolumny SPE Oasis MCX (Waters). Kwas abscysynowy wymywano z kolumny SPE za pomocą metanolu [Dobrev i Kaminek 2002]. Po odparowaniu metanolu, suchą zawartość rozpuszczono ponownie w 50 µl metanolu, przefiltrowano i umieszczono w aparacie do analiz HPLC-MS-MS. Wybrane fitohormony (auksyny, kwas abscysynowy, salicylowy i jasmonowy oraz cytokiny) zostały oznaczone zgodnie z procedurą opisaną przez Hura i in. [2017]. Próbkę ekstrahowano (5 min, 30 Hz, MM400, Retch, Haan, Niemcy) w 1 cm³ buforu ekstrakcyjnego (metanol/woda/kwas mrówkowy, MeOH/H₂O/HCOOH, 15/4/1 v/v/v) po dodaniu roztworu wzorca wewnętrznego. Próbkę odwirowano (3 min 22 000 x g, R32, Hettich, Tuttlingen, Niemcy), zebrano supernatant i etap ekstrakcji powtórzono dwukrotnie. Połączony supernatant odparowano pod N₂, ponownie zawieszono w 5% MeOH w 1 M HCOOH i oczyszczono na wkładach SPE w trybie mieszanym (BondElutPlexa PCX, Agilent, Santa Clara, CA, USA) [Dziurka i in. 2016]. Fitohormony analizowano za pomocą ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej (UHPLC) przy użyciu urządzenia Agilent Infinity 1260 połączonego ze źródłem jonów 6410 Triple Quad LC/MS z interfejsem elektrorozpylania (ESI) (Agilent Technologies, USA). Rozdział osiągnięto na kolumnie analitycznej Ascentis Expres RP-Amid (2,7 µm, 2,1 mm × 150 mm; Supelco, Bellefonte, PA, USA) przy liniowym gradiencie H₂O vs. acetonitryl z 0,01% HCOOH. Stabilny znakowany izotopowo wzorec wewnętrzny fitohormonów składał się z: [¹⁵N₄]dihydrozeatyny, [¹⁵N₄]kinetyny, [²H₅]kwasu indolilo-3-octowego, kwasu [²H₆]cis,trans-abscysynowego, [²H₅]kwasu salicylowego i [²H₅]kwasu jasmonowego (OlChemIm, Ołomuniec, Republika Czeska). Ukierunkowane profilowanie fitohormonów prowadzono z wykorzystaniem monitorowania wielokrotnych reakcji (MRM) z porównaniem z danymi uzyskanymi dla czystych i stabilnych wzorców znakowanych izotopowo badanych

związków. Oznaczono następujące formy hormonów: IAA, kinetyna (KIN), zeatyna (ZEA), Topolina, ABA, SA, JA. Dane przedstawiono jako ng g^{-1} DW. Analizy przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

5.3.10. Ocena dyskryminacji węgla ^{13}C

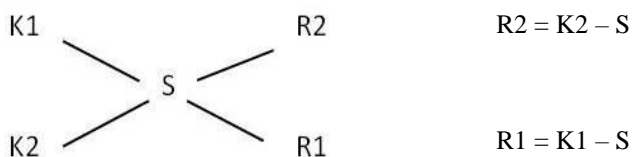
Badania izotopu ^{13}C polegają na wyznaczeniu dyskryminacji, czyli obniżenia zawartości izotopu ^{13}C w badanej próbce, w stosunku do wzorca. Wzorzec jest już zapisany w danej maszynie analitycznej. Zazwyczaj jako wzorzec zawartości ^{13}C stosuje się złoże o dużej zawartości tego pierwiastka i tak samo w przypadku azotu (np. wzorzec węgla z oznaczeniem procentu węgla w CO_2 , wzorzec azotu z podziemnego metanu lub z wcześniej ustalonej próbki jakiegoś związku chemicznego). Ponieważ wskaźnik dyskryminacji wylicza się poprzez odjęcie od zawartości ^{13}C w próbce zawartości tego izotopu we wzorcu otrzymuje się wartości ujemne. Oznacza to, że większa dyskryminacja wiąże się z mniejszą wartością wskaźnika dyskryminacji.

Próbki przeznaczone do analizy suszono w 105°C przez 24h, a następnie mielono w moździerzu. Pomiary zawartości izotopu ^{13}C wykonano metodą spektroskopii IRMS za pomocą aparatu Finnigan MAT 253 Mass Spectrometer, pracującego w trybie ciągłego przepływu dzięki podłączeniu do analizatora elementarnego Flash HT. Naważki próbek w naczynkach pomiarowych umieszczono w mineralizatorze, a próbki spalano w temperaturze 1020°C . W celu upewnienia się, że próbki zostały całkowicie spalone, do systemu wstrzyknięto niewielką ilość tlenu. Powstały dwutlenek węgla rozdzielano na ogrzanej do 45°C kolumnie chromatograficznej, a jako gazu nośnego użyto helu. Rozdzielone próbki wstrzykiwano do aparatu IRMS poprzez interfejs ConFlo IV. Do kalibracji systemu użyto certyfikowanych standardów izotopowych: USGS 40, USGS 41, IAEA 600 [Coplen i in. 2006]. Analizy zostały przeprowadzone w Instytucie Nauk Geologicznych PAN w Warszawie.

Badania kalibracyjne wykonane na spektrometrze pomiarowym pokazują, że błąd standardowy pomiarów stężenia izotopów azotu wynosi ok. 1% wartości mierzonej.

5.3.11. Określenie udziału azotu pobranego przez bakterie brodawkowe w ogólnym pobieraniu azotu przez rośliny, przy wykorzystaniu siarczanu amonu o zwiększonym udziale izotopu ^{15}N

Wartości graniczne to jednostki umowne oznaczające wielkość sygnału analizy spektrometrii mas. Kontrolę 1 stanowiły rośliny rukoli pochodzące z rodziny innej niż bobowate, uprawiane na glebie wzbogaconej w ^{15}N i wynosiła ona 224,21. Kontrolę 2 stanowiły rośliny rukoli, uprawiane na glebie bez dodatku ^{15}N i wynosiła 7,61. Aby wyliczyć procentowy udział biologicznego i włośnikowego pobierania azotu zastosowano podany niżej wzór, gdzie: S to wartości dla roślin strączkowych rosnących na glebie wzbogaconej w ^{15}N .



Wzrost pobierania azotu przez brodawki powoduje, że wartości S zmniejszają się, a wzrost pobierania azotu przez włośniki zwiększa wartości S. Wartości te oscylują pomiędzy wartościami K1 i K2. Aby obliczyć procentowy udział biologicznego wiązania azotu w całkowitym pobieraniu azotu wyliczono R1, czyli od K1 odjęto wartość S dla danej próbki i podobnie w przypadku procentowego udziału włośnikowego pobierania azotu w całkowitym pobieraniu tego pierwiastka obliczono R2, czyli od K2 odjęto wartość S. Wartości R1 i R2 odpowiadają stosunkowi intensywności obydwu procesów pobierania azotu. Po otrzymaniu wartości R1 i R2 wyliczono procentowy udział procesu wiązania „brodawkowego” lub „włośnikowego”, według niżej podanych wzorów. Suma obydwu udziałów wynosi 100%.

$$\% \text{ wiązania brodawkowego} = \frac{R1}{R1 + R2}$$

$$\% \text{ wiązania włośnikowego} = \frac{R2}{R1 + R2}$$

5.3.12. Oznaczenie aktywności reduktazy azotanowej metodą *in vivo*

Aktywność reduktazy azotanowej oznaczono w trzecim liściu od góry. Zebrane tkanki roślinne poddano inkubacji w mieszaninie z azotanami oraz w mieszaninie bez azotanów. Mieszanina pierwsza składała się z 0,1M buforu fosforanowego (pH 7,5), 0,1M KNO₃ i 2% propanolu. Skład mieszaniny drugiej był taki sam, ale nie zawierał azotanu. Inkubacja w zamkniętych kolbach trwała 1h w temperaturze 30°C. Po tym czasie zawartość kolb wymieszano i 1 cm³ przeniesiono do probówek, a następnie dodano 1cm³ 1% sulfanilamidu w 1M HCl (SAA) oraz 1cm³ 0,01% dichlorowodoru *N*-(1-naftylo)-etylenodiaminy (NED). Równolegle wykonano próbę kontrolną. Absorbancję zmierzono przy 540 nm, stosując kontrolę – próbkę bez azotanów, jako próbkę odniesienia. Wykonano krzywą wzorcową i obliczono liczbę nanomoli azotynów wytworzonych w czasie reakcji enzymatycznej. Aktywność enzymu przedstawiono jako liczbę nanomoli NO₂ powstałego w ciągu 1 h w przeliczeniu na 1 g świeżej masy [Jaworski 1971]. Analizę wykonano w 5 powtórzeniach.

5.3.13. Oznaczenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych

Świeże liście (trzęcie w pełni rozwinięte od góry rośliny) homogenizowano z 50 mM buforem fosforanowo-potasowym (pH = 7,0) zawierającym 0,1 mM EDTA (100 mg świeżej masy materiału roślinnego w 1 cm³ buforu). Po odwirowaniu (10 000 × *g*, przez 15 min w 4°C, 32R, Hettich, Niemcy), supernatant pobrano z próbki i przeniesiono na 96-studzienkową płytkę (Synergy II, Biotek, Winooski, VT). Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD, EC 1.15.1.1) przeprowadzono metodą redukcji cytochromów według McCorda i Fridovic [1969]. Aktywność katalazy (CAT, E.C. 1.11.1.6) mierzono przy 240 nm zgodnie z metodą Aebi [1984] z H₂O₂ jako substratem. Aktywność peroksydazy (POX, EC 1.11.1.7) oznaczono metodą Lücka [1962] z *p*-fenylenodiaminą jako substratem, a absorbancję odczytano przy 485 nm. Przeprowadzone analizy zostały przeprowadzone według Grudysa i in. [2018]. Białko analizowano metodą Bradford [1976]. Wszystkie pomiary wykonano w trzech powtórzeniach dla każdej odmiany i kombinacji. Aktywność katalazy i peroksydazy wyrażano w μmol H₂O₂ min⁻¹ mg białka. Aktywność SOD wyrażono w U/μg białka, gdzie U oznacza ilość enzymu (białka) powodującą inhibicję aktywności tworzenia anionorodnika ponadtlenkowego o 50% (inhibicję szybkości redukcji cytochromu c), co oznacza spadek absorbancji mierzonej przy 550 nm o 0,0125 jednostek w ciągu 1 minuty.

5.3.14. Analiza ekspresji genów warunkujących wytwarzanie brodawek korzeniowych

Izolacja RNA

Ekspresję genów *Nod* badano w tkankach korzeni roślin traktowanych pięcioma szczepionkami bakteryjnymi pochodzącymi od różnych producentów: Nitraginą Biofood, Nitraginą IUNG, Nitroflorą Mycoflor, HiStick® Soy i *Rhizobium* Bio-Gen. Kontrolę stanowiły korzenie roślin nieinokulowanych. Rośliny odmiany soi „Małaga” rosły w perlicie podlewanym Azofoska i Florovitem, jak opisano w rozdziale 5.2. w doświadczeniu 4.

Do izolacji RNA pobierano próbki korzeni bocznych o masie 0,03–0,05 g. Dla każdej odmiany pobierano fragmenty korzeni z trzech losowo wybranych roślin. Próbki po pobraniu natychmiast zamrażano w ciekłym azocie, po czym przenoszono do -80°C . Izolację RNA przeprowadzano przy użyciu kitu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy): Zamrożone próbki ucierano z metalowymi kulkami o średnicy 3 mm (Tissue LyBSr, Qiagen). Do tak przygotowanego proszku dodano 450 μl buforu RLT (zawierającego izotiocyanian guanidyny oraz β -merkaptioetanol) lizującego i denaturującego białka. Lizat przenoszono na kolumnę homogenizacyjną QIAshredder i wirowano przez 2 min przy 13 200 rpm (Eppendorf AG, Hamburg Niemcy). Do otrzymanego przesączu dodawano i od razu mieszano 96% etanol w ilości odpowiadającej połowie objętości przesączu (zazwyczaj 200-300 μl). Otrzymaną mieszaninę przenoszono na kolumnę do izolacji RNeasy, która w swoim złożu wiązała odwodnione etanolem RNA. Kolumny z próbkami wirowano (15 s przy 11 000 rpm), po czym wylewano przesącz. W celu oczyszczenia preparatu RNA, na kolumnę aplikowano 700 μl buforu RW1, wirowano 15 s przy 10 000 rpm i wylewano przesącz. Następnie preparat RNA przemywano 500 μl buforu RPE, wirowano przez 15 s przy 10 000 rpm i wylewano przesącz. Tą czynność powtórzono i osuszono kolumny. RNA eluowano, aplikując 30 μl wody sterylnej bezpośrednio na kolumnę i wirując przez 1 min przy 10 000 rpm. Uzyskany eluat aplikowano na kolumnę i wirowano tak jak poprzednio w celu zwiększenia stężenia uzyskanego preparatu RNA. Otrzymane RNA przechowywano w temperaturze -80°C .

Odwrotna transkrypcja

Etap odwrotnej transkrypcji wykonano przy pomocy kitu QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Przed wykonaniem reakcji odwrotnej transkrypcji wykonano trawienie genomowego DNA. Matrycę dla reakcji stanowiło RNA o stężeniu ok. 300 ng/ μl

(sprawdzane w próbkach przy pomocy spektrofotometru Ultrospec 2100 Pro firmy Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). Do matrycy dodano bufor trawiący DNA gDNA Wipeout Buffer oraz wodę wolną od RNA (Tabela 7), po czym mieszano i inkubowano w temperaturze 42°C przez 2 min.

Tabela 7. Skład mieszaniny reakcyjnej do trawienia DNA.

Składnik	Objętość na jedną próbkę [μ l]
7x gDNA Wipeout Buffer	2
RNA	2
RNase-free water	10
RAZEM	14

Po inkubacji do mieszaniny reakcyjnej dodano: bufor Quantiscript RT Buffer (posiada on jony Mg^{2+} oraz trifosforany deoksyrybonukleotydów), roztwór enzymu odwrotnej transkryptazy Quantiscript Reverse Transcriptase (zawierającej inhibitor RNaz) oraz mieszaninę starterów RT Primer Mix (Tabela 8). W mieszaninie starterów znajdowały się startery oligo-dT, które pozwalają na syntezę pierwszej nici cDNA od końca 3' mRNA - poli(A) oraz tzw. *random primers*, czyli krótkie startery o losowej sekwencji nukleotydów przyłączające się do mRNA w losowych miejscach. Następnie, całość wymieszano i inkubowano w 42°C przez 15 min, po czym zatrzymywano reakcję poprzez termiczną inaktywację odwrotnej transkryptazy w 95°C przez 3 min.

Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej do odwrotnej transkrypcji.

Składnik	Objętość na jedną próbkę [μ l]
5x Quantiscript RT Buffer	4
Quantiscript Reverse Transcriptase	1
RT Primer Mix	1
Roztwór RNA po trawieniu gDNA	14
RAZEM	20

Real-time PCR

Każda reakcja PCR przeprowadzana była w 3 powtórzeniach biologicznych. Składniki mieszaniny reakcyjnej do real-time PCR (Tabela 9) aplikowano do 96-dołkowej płytki (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), po czym zabezpieczano folią adhezyjną (Applied Biosystems) i wkładano do termocyklera (7500 real-time PCR System, Applied Biosystems) zaprogramowanego w następujący sposób:

- wstępna denaturacja i aktywacja polimerazy w temperaturze 95°C – 10 min, przy wyłączonej optyce,
- denaturacja przez 15 s w temperaturze 95°C przy wyłączonej optyce oraz przyłączanie starterów i elongacja przez 60 s w temperaturze 60°C przy włączonej optyce (całość 40 cykli).

Tabela 9. Skład mieszaniny reakcyjnej do real-time PCR.

Składnik	Objętość na jedną próbkę [μl]	Stężenie końcowe
Sterylna woda	5,0	-
Starter Forward	2,5	900 nM
Starter Reverse	2,5	900 nM
TaqMan PCR Master Mix	12,5	1 x
10 x rozcieńczone cDNA	2,5	ok. 38 ng
RAZEM	25	-

TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems) zawiera dNTPy (wraz z dUTP), polimerazę DNA AmpliTaq Gold®, uracylo-N-glikozydazę AmpErase® oraz jony Mg²⁺.

Sekwencje starterów zaczerpnięto z Wang i in. [2019]. Sekwencje starterów podano w Tabeli 10.

Tabela 10. Sekwencje (5'-3') starterów wykorzystywanych do analizy zmian w ekspresji genów *NORKb*, *NIC1* i *NOD21*.

Gen	Startery	
	forward	reverse
<i>NORKb</i>	AAATTGTGAGCGGCAGGGAA	GCATGGACCATACCCATTCA
<i>NIC1</i>	GCCAAAGGTTGTTACGAGAA	GCAAACTTGCCTTCAGGAGC
<i>NOD 21</i>	AGACTTGGAGATGGAGATGG	GGAACCTTACACAAGATTTTC

Oprócz oznaczeń badanych próbek, raz na kilka płytek 96-dołkowych, wykonywano również oznaczenia na serii rozcieńczeń cDNA losowo wybranych roślin (10 x, 100 x, 1000 x i 10000 x), które posłużyły do sporządzenia krzywych standardowych dla genu standardu wewnętrznego i genów docelowych.

Obliczenia miały charakter względny z zastosowaniem genu referencyjnego *GmATPsynthase* [Madsen i in. 2003]. Zastosowano metodę krzywych standardowych z modyfikacją [Pfaffl 2001]. Analizę danych uzyskanych z reakcji real-time PCR rozpoczynano od przygotowania dokumentu RQ Study w programie 7500 System SDS Software (Applied Biosystems), który poprzednio posłużył do zaprogramowania reakcji. Dla każdej próbki odczytywano wartość CT (cykl, w którym amplifikacja osiągnęła wartość progową – Threshold cycle), następnie uśredniano wartości CT dla trzech powtórzeń analitycznych odrzucając najbardziej odbiegającą od pozostałych, jeżeli błąd standardowy wynosił więcej niż 5% średniej. Następnie sporządzono krzywe standardowe (zależność CT od stężenia cDNA w próbce) dla każdego genu w arkuszu programu Microsoft Excel. Nachylenie poszczególnych krzywych standardowych służyło do obliczenia wydajności amplifikacji na cykl, która następnie służyła do obliczenia liczby kopii docelowych genów w odniesieniu do genu referencyjnego. Liczbę kopii danego genu w próbkach badanych podawano jako krotność liczby kopii tego genu w próbkach kontrolnych (bez szczepionki).

5.3.15. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie wariancji (ANOVA jedno- lub wieloczynnikowa) w programie Statistica 13 (Stat-Soft, Inc., Tulsa, OK, USA). Występowanie różnic między dwoma obiektami sprawdzano za pomocą testu t-Studenta ($p < 0,05$). Istotność zróżnicowania pomiędzy wieloma obiektami analizowano za pomocą wielokrotnego testu Duncana ($p < 0,05$). Pomędzy wybranymi parametrami wyliczono współczynniki korelacji Pearsona ($p < 0,05$). Na wykresach przedstawiono średnie \pm BS (błąd standardowy).

6. Wyniki

6.1. Analiza warunków atmosferycznych

Na podstawie analizy danych meteorologicznych w 2018 roku suma opadów w Krakowie wynosiła 569,3 mm (Tabela 11), natomiast w okresie wegetacji najsuchszym miesiącem był kwiecień, w którym suma opadów wynosiła tylko 12,5 mm. Najwięcej opadów odnotowano w lipcu, i wynosiły one 142 mm. W 2018 roku w okresie wegetacji roślin uprawianych od kwietnia do sierpnia średnia temperatura wynosiła 18°C, a od kwietnia do października 16,6°C (Tabela 11). Na podstawie współczynnika Sielianinowa, biorącego pod uwagę sumę opadów i temperatur w danym miesiącu, w okresie wegetacji roślin, kwiecień w tym roku był skrajnie suchy ($HTC = 0,31$), wrzesień był suchy, a maj, czerwiec i sierpień dość suche. Wilgotny natomiast był natomiast lipiec.

W 2019 roku suma opadów wynosiła 638,5 mm (Tabela 12). Rok ten charakteryzował się małą ilością opadów w lutym i marcu, a najsuchszym miesiącem był czerwiec z opadami 124 mm. W 2019 roku miesiące, w których przebiegała wegetacja soi, były dużo chłodniejsze niż w roku 2018. Od kwietnia do sierpnia średnia temperatura wynosiła 16,6°C, od kwietnia do września 16,5°C, a do października 15,6°C (Tabela 12). Kierując się współczynnikiem Sielianinowa, w tym roku kwiecień był wilgotny, a maj skrajnie wilgotny. Z kolei czerwiec był bardzo suchy, a lipiec i sierpień dość suche. Wrzesień był natomiast dość wilgotny.

W 2020 roku odnotowano małą ilość opadów w styczniu i bardzo niską ilość opadów w kwietniu (4,4 mm). Najwięcej deszczu spadło w sierpniu (108,2 mm). Suma opadów dla tego roku wyniosła 671,8 mm (Tabela 13). W okresie wegetacji w 2020 roku odnotowano jeszcze niższe średnie temperatury niż w poprzednich latach. Średnia temperatura od kwietnia do lipca wynosiła 12,5°C, a od kwietnia do sierpnia 15,7°C (Tabela 13). Kwiecień ponownie był bardzo suchy ($HTC=0,15$), a maj z kolei bardzo wilgotny ($HTC=2,5$). Okres od czerwca do września był optymalny.

Tabela 11. Średnia, maksymalna i minimalna temperatura, suma opadów miesięcznych oraz współczynnik hydrotermiczny Sielianinowa (HTC) w roku 2018 na terenie Krakowa [IMGW-PIB, OGIMET].

Miesiąc	Średnia temperatura [°C]	Max. śr. temp. [°C]	Min. śr. temp. [°C]	Suma opadów [mm]	Współczynnik HTC Sielianinowa
I	0,9	4,1	- 2,0	18,0	6,45
II	- 3,0	- 0,5	- 5,1	10,0	1,19
III	0,7	5,8	- 4,1	19,0	8,76
IV	13,5	12,5	10,0	12,5	0,31
V	17,2	23,3	10,8	69,0	1,29
VI	18,8	24,7	13,9	72,0	1,28
VII	19,9	25,9	14,7	142,0	2,30
VIII	20,6	26,5	15,2	71,0	1,11
IX	15,8	11,4	9,3	43,8	0,92
X	10,4	16,8	5,4	52,0	1,61
XI	4,5	8,6	1,7	12,0	0,89
XII	1,2	3,2	- 1,3	48,0	12,90

HTC = $P/0,1 \sum t$, P – suma miesięczna opadów atmosferycznych w mm, $\sum t$ – miesięczna suma temperatur powietrza $>0^{\circ}\text{C}$.

Tabela 12. Średnia, maksymalna i minimalna temperatura, suma opadów miesięcznych oraz współczynnik hydrotermiczny Sielianinowa (HTC) w roku 2019 na terenie Krakowa [IMGW-PIB, OGIMET].

Miesiąc	Średnia temperatura [°C]	Max. śr. temp. [°C]	Min. śr. temp. [°C]	Suma opadów [mm]	Współczynnik HTC Sielianinowa
I	1,8	0,8	- 4,2	52,6	9,43
II	2,9	8,4	- 1,4	13,4	1,65
III	6,2	11,7	1,4	23,9	1,24
IV	10,0	16,0	4,6	72,7	2,42
V	12,4	17,2	8,4	124,9	3,25
VI	22,3	28,5	15,9	4,2	0,06
VII	19,2	25,4	13,5	74,7	1,26
VIII	20,3	26,7	15,0	79,3	1,26
IX	14,5	20,2	9,9	78,3	1,80
X	10,4	17,6	5,1	35,5	1,10
XI	5,9	9,8	2,7	43,3	2,45
XII	2,7	6,4	-0,7	35,7	4,27

HTC = $P/0,1 \sum t$, P – suma miesięczna opadów atmosferycznych w mm, $\sum t$ – miesięczna suma temperatur powietrza $>0^{\circ}\text{C}$.

Tabela 13. Średnia, maksymalna i minimalna temperatura, suma opadów miesięcznych oraz współczynnik hydrotermiczny Sielianinowa (HTC) w roku 2020 na terenie Krakowa [IMGW-PIB, OGIMET].

Miesiąc	Średnia temperatura [°C]	Max. śr. temp. [°C]	Min. śr. temp. [°C]	Suma opadów [mm]	Współczynnik HTC Sielianinowa
I	1,0	4,6	-2,2	20,5	6,61
II	4,0	8,3	0,2	75,8	6,53
III	4,9	10,9	-0,2	15,2	1,00
IV	9,5	17,0	1,1	4,4	0,15
V	11,4	17,4	5,5	88,3	2,50
VI	18,1	23,2	14,0	72,9	1,34
VII	19,0	25,3	13,1	65,5	1,11
VIII	20,3	26,7	14,7	108,6	1,73
IX	15,1	21,2	9,7	79,2	1,75
X	10,2	14,8	6,7	95,9	3,03
XI	4,7	8,4	1,5	23,3	1,65
XII	1,0	3,7	-1,3	22,2	7,16

HTC = $P/0,1 \sum t$, P – suma miesięczna opadów atmosferycznych w mm, $\sum t$ – miesięczna suma temperatur powietrza >0°C.

6.2. Doświadczenie 1. Wpływ terminu siewu nasion soi uprawnej na plonowanie

Doświadczenie prowadzono w trzech sezonach wegetacyjnych w latach 2018 – 2020. W każdym sezonie stosowano inne odmiany soi uprawnej i prowadzono doświadczenie z różnymi modyfikacjami. W 2018 roku uprawiano tylko jedną odmianę „Petrina”, a część nasion inokulowano szczepionką bakteryjną. Nasiona wysiewano w ośmiu terminach (doświadczenie 1A). W 2019 r. uprawiano odmianę „Abelina”, „Merlin” i „Petrina”, przy czym część nasion przykrywano w najwcześniejszym terminie siewu agrowłókniną. W tym roku badano wpływ trzech terminów siewu na plon nasion (doświadczenie 1B). W 2020 roku prowadzono doświadczenie również na tych trzech odmianach, tak jak w 2019 roku, ale wysiewano je w dwóch terminach (doświadczenie 1C).

6.2.1. Doświadczenie 1A. Wpływ terminu siewu i szczepionek bakteryjnych na plonowanie soi uprawnej odmiany „Petrina”

Doświadczenie zostało przeprowadzone na bardzo późnej odmianie soi uprawnej „Petrina”, którą wysiewano w ośmiu terminach od 12. kwietnia do 12. lipca 2018 roku. Rok ten był stosunkowo suchym rokiem, charakteryzującym się bardzo niską ilością opadów w okresie zimowym i wiosennym. Najbardziej korzystnym terminem siewu dla uzyskania największej liczby strąków, liczby nasion i ich masy był 21. maja (Tabela 14). W tym miesiącu odnotowano wyższą ilość opadów w porównaniu do kwietnia (Tabela 11). Współczynnik HTC dla tego miesiąca wynosił 1,29, co oznacza, że był to miesiąc dość suchy, jednakże poprzedzający go kwiecień był skrajnie suchy, dla którego HTC wynosił 0,31. Masa tysiąca nasion uzyskana z roślin z wysiewu 21. maja była jednak równie wysoka, jak w przypadku nasion zebranych z roślin wysiewanych 12. kwietnia i 4. maja (Tabela 14). W tych dwóch ostatnich wymienionych terminach uzyskano mniejszą liczbę strąków, nasion i ich masę w przeliczeniu na jedną roślinę, co mogło być spowodowane niską ilością opadów. Mniejsza liczba nasion, przy porównywalnej MTN oznaczałaby, że masa jednego nasiona była większa niż w plonie uzyskanym z siewu z 21. maja.

Piątego czerwca 2018 roku wysiano nasiona soi uprawnej w dwóch wariantach. Jedną partię nasion inokulowano szczepionką bakteryjną Nitragina IUNG. Z roślin wysiewanych 5. czerwca uzyskano podobny plon z roślin niezależnie od zastosowanej szczepionki, natomiast w przypadku siewu 25. czerwca z roślin nieinokulowanych uzyskano najniższą średnią liczbę strąków, liczbę nasion i ich masę w przeliczeniu na jedną roślinę. Dodanie szczepionki do części nasion wysiewanych 25. czerwca istotnie zwiększyło wszystkie parametry plonu z wyjątkiem MTN. Należy zwrócić uwagę, że średnia temperatura od czerwca do października 2018 roku wynosiła 16,7°C i była niższa od średniej temperatury obliczanej dla okresu od kwietnia do sierpnia, w którym były uprawiane rośliny wysiewane w najwcześniejszym terminie. Niższy plon uzyskano również z roślin wysiewanych 12. lipca, z których zbiór nastąpił 16. października. Współczynniki HTC dla poszczególnych miesięcy tego okresu wegetacji wynosiły odpowiednio 2,30; 1,11; 0,92; 1,61 (Tabela 11). Jedynie lipiec, w którym wysiewano nasiona, był wilgotny, a sierpień i wrzesień były dość suche. Wszystkie badane parametry plonu pochodzącego z roślin wysiewanych 12. lipca były istotnie niższe od parametrów uzyskanych z roślin wysiewanych we wcześniejszych terminach. Rośliny wysiewane 27. lipca co prawda wytworzyły strąki, ale nie zebrano już z nich plonu ze względu na bardzo małą liczbę i masę nasion. Z kolei, rośliny z nasion wysiewanych w sierpniu zatrzymały się w fazie siewki, pomimo wysokiej temperatury

panującej w tym miesiącu (średnia w sierpniu 20,6°C) i dostatecznej ilości opadów (71 mm). Współczynnik HTC jednak dla tego miesiąca wynosił 1,11, co oznacza że był dość suchy.

Tabela 14. Wpływ terminu siewu w 2018 roku soi uprawnej odmiany „Petrina” oraz zastosowania szczepionki bakteryjnej (Nitragina IUNG) na parametry plonu. Średnie (n = 20) w kolumnach zaznaczone różnymi literami różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; p < 0,05).

Termin siewu i zbioru	Okres wegetacji (dni)	Średnia liczba strąków / roślinę	Średnia liczba nasion / roślinę	Średnia waga nasion / roślinę [g]	Masa tysięcy Nasion [g]
I 12.04. / 31.08.	141	40,2 ± 3,8 ^{ab}	87,1 ± 7,3 ^b	17,86 ± 1,33 ^b	204,91 ± 10,53 ^a
II 4.05. / 3.09.	122	25,9 ± 2,3 ^c	56,2 ± 4,9 ^c	11,93 ± 0,97 ^c	212,33 ± 18,42 ^a
III 21.05. / 13.09.	115	46,3 ± 4,1 ^a	107,9 ± 9,8 ^a	20,66 ± 1,43 ^a	191,53 ± 16,21 ^a
IV A 5.06. / 25.09.	112	36,6 ± 2,9 ^b	86,5 ± 7,4 ^b	12,99 ± 0,72 ^c	150,22 ± 10,21 ^b
IV B 5.06. / 25.09.	112	35,0 ± 3,2 ^b	80,4 ± 7,9 ^b	12,96 ± 0,91 ^c	161,23 ± 11,51 ^b
V A 25.06. / 15.10.	112	14,0 ± 0,9 ^f	31,9 ± 2,5 ^e	4,48 ± 0,71 ^e	138,49 ± 8,43 ^c
V B 25.06. 15.10.	112	20,0 ± 1,4 ^d	46,6 ± 3,4 ^d	6,40 ± 0,42 ^d	139,27 ± 8,91 ^c
VI 12.07. 16.10.	96	17,6 ± 1,1 ^e	39,9 ± 3,2 ^e	4,33 ± 0,53 ^e	108,43 ± 9,62 ^d
VII 27.07. / 27.10.	92	–	–	–	–
VIII 29.08. / –	–	–	–	–	–

A – siew nasion bez inokulacji szczepionką, B – siew nasion inokulowanych szczepionką bakteryjną (Nitragina IUNG); – brak danych; rośliny z siewu 29.08 – rośliny zatrzymały się w fazie siewki.

6.2.2. Doświadczenie 1B. Wpływ terminu siewu i zastosowania agrowłókniny w okresie kiełkowania na plonowanie soi uprawnej odmiany „Abelina”, „Merlin” i „Petrina”

W 2019 roku przeprowadzono doświadczenie wpływu terminu siewu trzech odmian soi uprawnej: „Abeliny”, „Merlina” i „Petriny”. W przypadku terminu kwietniowego zastosowano agrowłókninę, w celu ochrony kiełkujących nasion przed możliwymi przymrozkami. Ponadto, agrowłóknina utrzymuje wyższą wilgotność gleby i podwyższa jej temperaturę, co stwarza bardziej optymalne warunki dla kiełkowania nasion soi, wrażliwej na chłód. Jak wynika z Tabeli 12. w kwietniu najniższa temperatura wynosiła 4,6°C, i był jeden dzień, w którym spadł śnieg.

Tabela 15. Wpływ terminu siewu w 2019 roku na parametry plonu trzech odmian soi uprawnej: „Abelina”, „Merlin”, „Petrina”. W przypadku pierwszego terminu siewu część roślin była przykryta agrowłókniną. Średnie ($n = 20$) \pm BS zaznaczone w kolumnach tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).

Termin siewu i zbioru	Okres wegetacji (dni)	Odmiana	Średnia liczba strąków /roślinę	Średnia liczba nasion /roślinę	Średnia masa nasion [g]/roślinę	Masa tysiąca nasion [g]
I 9.04. / 30.08.	143	Abelina	23,2 \pm 3,2 ^c	56,2 \pm 5,4 ^c	8,42 \pm 0,91 ^c	150,42 \pm 10,31 ^b
		Merlin	17,1 \pm 1,5 ^d	38,3 \pm 2,8 ^e	4,58 \pm 0,32 ^e	120,53 \pm 10,22 ^c
		Petrina	86,2 \pm 7,8 ^a	187,1 \pm 19,5 ^a	33,20 \pm 4,52 ^a	177,52 \pm 14,58 ^a
I 9.04. / 30.08. + agrowłóknina	143	Abelina	24,3 \pm 1,8 ^c	60,4 \pm 6,9 ^c	8,80 \pm 1,13 ^c	154,23 \pm 15,19 ^b
		Merlin	18,9 \pm 2,1 ^d	45,9 \pm 4,1 ^d	5,23 \pm 0,29 ^d	123,53 \pm 12,12 ^c
		Petrina	92,3 \pm 8,8 ^a	197,8 \pm 20,7 ^a	36,76 \pm 3,12 ^a	180,43 \pm 13,22 ^a
II 20.05. / 13.09.	133	Abelina	22,8 \pm 2,1 ^c	63,4 \pm 6,2 ^c	10,49 \pm 0,89 ^b	166,52 \pm 15,23 ^a
		Merlin	33,1 \pm 3,2 ^b	82,3 \pm 8,9 ^b	12,13 \pm 1,12 ^b	147,94 \pm 12,31 ^b
		Petrina	25,4 \pm 2,9 ^c	48,1 \pm 3,9 ^d	5,67 \pm 0,51 ^d	118,12 \pm 11,18 ^c
III 19.08. / –	–	Abelina	8,2 \pm 1,1 ^e	–	–	–
		Merlin	8,3 \pm 1,1 ^e	–	–	–
		Petrina	8,9 \pm 1,2 ^e	–	–	–

– brak danych

W pierwszym terminie siewu bez zastosowania agrowłókniny wszystkie parametry plonu były wyższe u odmiany „Petrina” w porównaniu do odmian „Abelina i „Merlin” (Tabela 15). Najślabiej plonowała odmiana „Merlin”. W pierwszym terminie siewu z zastosowaniem agrowłókniny uzyskano dla wszystkich odmian podobne wyniki, jak bez przykrywania roślin. Należy zaznaczyć, że odmiana „Petrina” w obu przypadkach plonowała zdecydowanie lepiej od pozostałych odmian, a odmiana „Merlin” plonowała najślabiej. W przypadku roślin wysiewanych w maju (25.05.) odmiana „Petrina” plonowała najniżej; wszystkie parametry plonu z wyjątkiem liczby strąków na roślinę były niższe w porównaniu do parametrów plonu uzyskanych z pozostałych odmian. Największą liczbę strąków, nasion i ich masę zebrano z odmiany „Merlin”, natomiast najwyższą MTN charakteryzowała się odmiana „Abelina”. Należy zaznaczyć, że maj 2019 roku był skrajnie wilgotny (HTC=3,25). Po tym miesiącu nastąpił skrajnie suchy czerwiec (HTC=0,06). Pomimo tych bardzo niekorzystnych warunków parametry plonowania dla odmiany „Abelina” i „Merlin” były porównywalne lub większe od parametrów plonu uzyskanych z roślin wysiewanych

w kwietniu. Warunki pogodowe silnie zróżnicowały reakcję badanych odmian na temperaturę i wilgotność gleby występujące w czasie wegetacji.

Nasiona wszystkich odmian wysianych w sierpniu wykiełkowały i wytworzyły strąki, jednakże nie zebrano już z nich plonu. Sierpień tego roku był dość suchy ($HTC=1,26$), z kolei wrzesień był dość wilgotny ($HTC=1,80$). W ostatnim terminie siewu liczba strąków była diametralnie mniejsza niż w przypadku roślin wysiewanych w kwietniu i maju.

W przypadku odmiany „Abelina” termin siewu nie wpłynął na badane parametry plonu z wyjątkiem MTN, która była istotnie wyższa u roślin wysiewanych w drugim terminie (20.05). Późniejszy termin siewu zwiększył istotnie plonowanie odmiany „Merlin”, natomiast drastycznie zmniejszył wszystkie parametry plonowania odmiany „Petrina”.

6.2.3. Doświadczenie 1C. Wpływ terminu siewu na plonowanie soi uprawnej odmiany „Abelina”, „Merlin” i „Petrina”

W 2020 roku powtórzono doświadczenie dotyczące wpływu terminu siewu na plonowanie odmian soi: „Abelina”, „Merlin” i „Petrina”. Nasiona wysiano w dwóch terminach: 22. kwietnia i 2. czerwca (Tabela 16). Długość okresu wegetacyjnego badanych odmian soi w 2020 roku była istotnie krótsza w porównaniu do roku 2019. Było to z pewnością związane z mniejszą ilością opadów występujących w okresie wegetacyjnym w 2020 roku. Analizując współczynniki HTC dla poszczególnych miesięcy tego okresu wegetacyjnego można stwierdzić, że kwiecień był skrajnie suchy, maj wilgotny, czerwiec optymalnie wilgotny, lipiec dość suchy, sierpień i wrzesień dość wilgotny (Tabela 13). Najwyższy plon nasion z roślin wysiewanych w kwietniu otrzymano z odmiany „Petrina”. Wszystkie analizowane parametry plonu były znacząco większe od parametrów plonu pozostałych odmian. Z roślin odmiany „Petrina” uzyskano o 65% więcej strąków i nasion w porównaniu do „Abeliny” i 75% w porównaniu do „Merlina”. Masa tysiąca nasion odmiany „Petrina” była o 21% większa niż MTN „Abeliny” i 23% od MTN „Merlina”. Najniżej plonowała odmiana „Merlin”. W przypadku siewu 2. czerwca liczba strąków z jednej rośliny dla wszystkich badanych odmian była podobna. Największą liczbę i masę nasion uzyskano z odmiany „Merlin”. Najwyższą MTN otrzymano w przypadku odmiany „Abelina”, natomiast najmniejszą masę nasion z rośliny, jak i MTN uzyskano z odmiany „Petrina”. Ta odmiana silnie zareagowała spadkiem plonu na przesunięcie terminu siewu.

Tabela 16. Wpływ terminu siewu soi uprawnej w 2020 roku na parametry plonu trzech odmian soi uprawnej: „Abelina”, „Merlin” i „Petrina”. Średnie ($n = 20$) \pm BS zaznaczone w kolumnach tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).

Termin siewu i zbioru	Długość wegetacji (dni)	Odmiana	Średnia liczba strąków /roślinę	Średnia liczba nasion /roślinę	Średnia masa nasion /roślinę	Masa tysiąca nasion [g]
I 22.04. 10.07.	79	„Abelina”	17,2 \pm 1,5 ^c	41,1 \pm 3,2 ^{de}	5,70 \pm 0,61 ^d	142,0 \pm 12,29 ^b
		„Merlin”	12,1 \pm 0,9 ^d	27,3 \pm 2,1 ^e	3,76 \pm 0,22 ^e	137,6 \pm 12,49 ^b
		„Petrina”	48,3 \pm 3,5 ^a	107,9 \pm 9,8 ^a	19,40 \pm 1,51 ^a	179,8 \pm 16,47 ^a
II 2.06. 2.09.	92	„Abelina”	20,8 \pm 1,4 ^b	49,4 \pm 3,7 ^{cd}	6,56 \pm 0,42 ^c	132,8 \pm 13,12 ^{bc}
		„Merlin”	24,8 \pm 1,8 ^b	60,9 \pm 5,4 ^b	7,77 \pm 0,52 ^b	127,5 \pm 11,41 ^c
		„Petrina”	17,4 \pm 1,3 ^c	38,8 \pm 3,2 ^e	3,68 \pm 0,21 ^e	95,0 \pm 8,39 ^d

6.3. Doświadczenie 2. Wpływ biostymulatorów na plonowanie soi uprawnej

Doświadczenie prowadzono w latach 2019 i 2020. W obu latach badano wpływ biostymulatorów na liczbę strąków i nasion oraz masę nasion. W 2019 r. wysiewano odmianę „Petrina”, którą traktowano następującymi stymulatorami: ASAHI SL, rozpuszczalnym krzemem, metanolem i zearalenonem (doświadczenie 2A). W 2020 r. uprawiano odmianę „Abelina” i „Merlin” i zastosowano te same stymulatory z wyjątkiem zearalenonu, ponadto oprócz parametrów plonu oznaczano zawartość fitohormonów w liściach w trzech terminach po aplikacji stymulatorów (doświadczenie 2B).

6.3.1. Doświadczenie 2A. Plonowanie soi odmiany „Petrina” pod wpływem biostymulatorów

Nasiona wysiano 9. kwietnia, a zbioru dokonano 30. sierpnia. Biostymulatory aplikowano w fazie kwitnienia (14. czerwca). Kwiecień 2019 roku był wilgotny, maj skrajnie wilgotny, natomiast czerwiec, w którym dokonano oprysku, był skrajnie suchy. Lipiec i sierpień były dość suche (Tabela12).

Jedynie metanol nie zmienił badanych parametrów plonu soi, w odróżnieniu od pozostałych biostymulatorów, które obniżyły liczbę strąków, nasion i ich masę w porównaniu do kontroli (Tabela17). Żaden z zastosowanych stymulatorów nie wpływał na MTN.

Tabela 17. Wpływ biostymulatorów na parametry plonu soi zwyczajnej odmiany „Petrina”. Średnie ($n = 20$) \pm BS zaznaczone w kolumnach tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).

Biostymulator	Średnia liczba strąków /roślinę	Średnia liczba nasion /roślinę	Średnia masa nasion /roślinę [g]	Masa tysięcy nasion [g]
Kontrola	40,9 \pm 3,4 ^a	87,1 \pm 8,2 ^a	17,86 \pm 1,42 ^a	204,92 \pm 19,31 ^a
ASAHI SL	30,4 \pm 2,8 ^b	63,9 \pm 5,9 ^b	13,09 \pm 1,21 ^b	204,83 \pm 19,72 ^a
Krzem	31,5 \pm 2,7 ^b	69,6 \pm 5,8 ^b	14,96 \pm 1,32 ^b	214,90 \pm 18,21 ^a
Metanol	37,8 \pm 3,1 ^a	82,3 \pm 7,5 ^a	16,49 \pm 1,44 ^a	200,39 \pm 19,49 ^a
ZEN	31,0 \pm 2,9 ^b	68,1 \pm 6,4 ^b	13,90 \pm 0,91 ^b	204,17 \pm 17,22 ^a

ASAHI SL – komercyjny preparat zawierający związki fenolowe; Na₂SiO₃ – rozpuszczalny krzem; Metanol – 12% roztwór wodny metanolu; ZEN – zearalenon.

6.3.2. Doświadczenie 2B. Analiza profilu hormonalnego w liściach oraz plonowania soi odmiany „Abelina” i „Merlin” pod wpływem biostymulatorów

Parametry plonu

Ze względu na brak pozytywnej reakcji odmiany „Petrina” na działanie zastosowanych stymulatorów pod względem plonowania, doświadczenie powtórzono w 2020 roku na dwóch innych odmianach: „Abelina” i „Merlin”.

Nasiona wysiano 22. kwietnia, a zbioru dokonano 24. sierpnia. Biostymulatory aplikowano w fazie kwitnienia 4. czerwca. Okres wegetacji w tym roku, z wyjątkiem kwietnia i lipca, był dość wilgotny (Tabela 18). Warunki pogodowe były zatem bardziej korzystne dla uprawy soi, niż w roku 2019.

W przypadku odmiany „Abelina” krzem i ZEN zwiększyły liczbę strąków, nasion i ich masę w stosunku do tych parametrów roślin kontrolnych, natomiast metanol zmniejszył jedynie liczbę nasion (Tabela 18). Podobne działanie metanolu zaobserwowano na roślinach odmiany „Merlin”, przy czym ten środek obniżył również liczbę strąków i masę nasion porównując do kontroli. Zearalenon zwiększył istotnie liczbę strąków i nasion, natomiast krzem nie zmienił wymienionych parametrów plonu. Masa tysięcy nasion była podobna dla obu odmian niezależnie od zastosowanego stymulatora.

Tabela 18. Wpływ biostymulatorów na parametry plonu soi uprawnej odmiany „Abelina” i „Merlin”. Wartości reprezentują średnie ($n = 20$) \pm BS. Średnie w kolumnach zaznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).

Odmiana	Biostymulator	Średnia liczba strąków/roślinę	Średnia liczba nasion/roślinę	Średnia masa nasion [g]/roślinę	Masa tysiąca nasion [g]
Abelina	Kontrola	17,2 \pm 1,4 ^b	40,1 \pm 3,4 ^b	5,70 \pm 0,41 ^b	142,2 \pm 13,51 ^a
	Krzem	22,9 \pm 1,9 ^a	54,6 \pm 5,1 ^a	7,75 \pm 0,62 ^a	142,3 \pm 12,91 ^a
	Metanol	16,2 \pm 1,3 ^b	35,4 \pm 3,2 ^c	5,14 \pm 0,49 ^b	145,1 \pm 13,19 ^a
	ZEN	21,3 \pm 1,7 ^a	47,1 \pm 3,5 ^{ab}	7,02 \pm 0,58 ^a	149,2 \pm 14,09 ^a
Merlin	Kontrola	12,1 \pm 1,1 ^c	27,3 \pm 1,9 ^d	3,76 \pm 0,21 ^c	138,2 \pm 13,08 ^a
	Krzem	12,7 \pm 1,2 ^c	27,2 \pm 2,1 ^d	3,76 \pm 0,32 ^c	138,4 \pm 12,47 ^a
	Metanol	9,8 \pm 0,7 ^d	18,6 \pm 1,2 ^e	2,60 \pm 0,24 ^d	139,3 \pm 12,42 ^a
	ZEN	17,3 \pm 1,2 ^b	33,1 \pm 2,6 ^c	3,76 \pm 0,25 ^c	114,2 \pm 10,41 ^b

Na₂SiO₃ – rozpuszczalny krzem; Metanol – 12% roztwór wodny metanolu; ZEN – zearalenon.

Aktywność fitohormonów pod wpływem biostymulatorów

Analiza wariancji wykazała istotny wpływ zastosowanych stymulatorów na poziom poszczególnych fitohormonów (Tabela 19). W przypadku wszystkich analizowanych hormonów w roślinach odmiany „Abelina” i „Merlin” wpływ czasu po zastosowaniu stymulatorów miał istotny wpływ na ich zawartość. W przypadku kwasu indolilo-3-octowego (IAA) i cytokinin (ZEA, KIN + TOP) rodzaj zastosowanego stymulatora nie miał znaczenia, z wyjątkiem istotnego wpływu dla kinetyny z topoliną w roślinach odmiany „Merlin”. Wspólny efekt terminu zbioru próbek i rodzaju stymulatora obserwowano u obu odmian dla kwasu abscysynowego (ABA), salicylowego (SA) i jasmonowego (JA).

Tabela 19. Analiza wariancji (ANOVA dwuczynnikowa) wpływu terminu analizy (T) i biostymulatorów (B) na poziom poszczególnych fitohormonów w liściach dwóch odmian soi („Abelina” i „Merlin”) w próbkach zbieranych w trzech terminach (1, 2 i 3 tygodnie po aplikacji stymulatorów). Gwiazdkami zaznaczono istotność wpływu danego czynnika: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; ns – nieistotny.

Odmiana	Czynnik	IAA	ABA	SA	JA	ZEA	KIN+TOP
Abelina	T	***	***	***	**	***	***
	B	ns	***	***	***	ns	ns
	TxB	ns	***	***	***	ns	ns
Merlin	T	**	***	***	***	***	***
	B	ns	***	**	**	ns	**
	TxB	ns	***	***	**	ns	ns

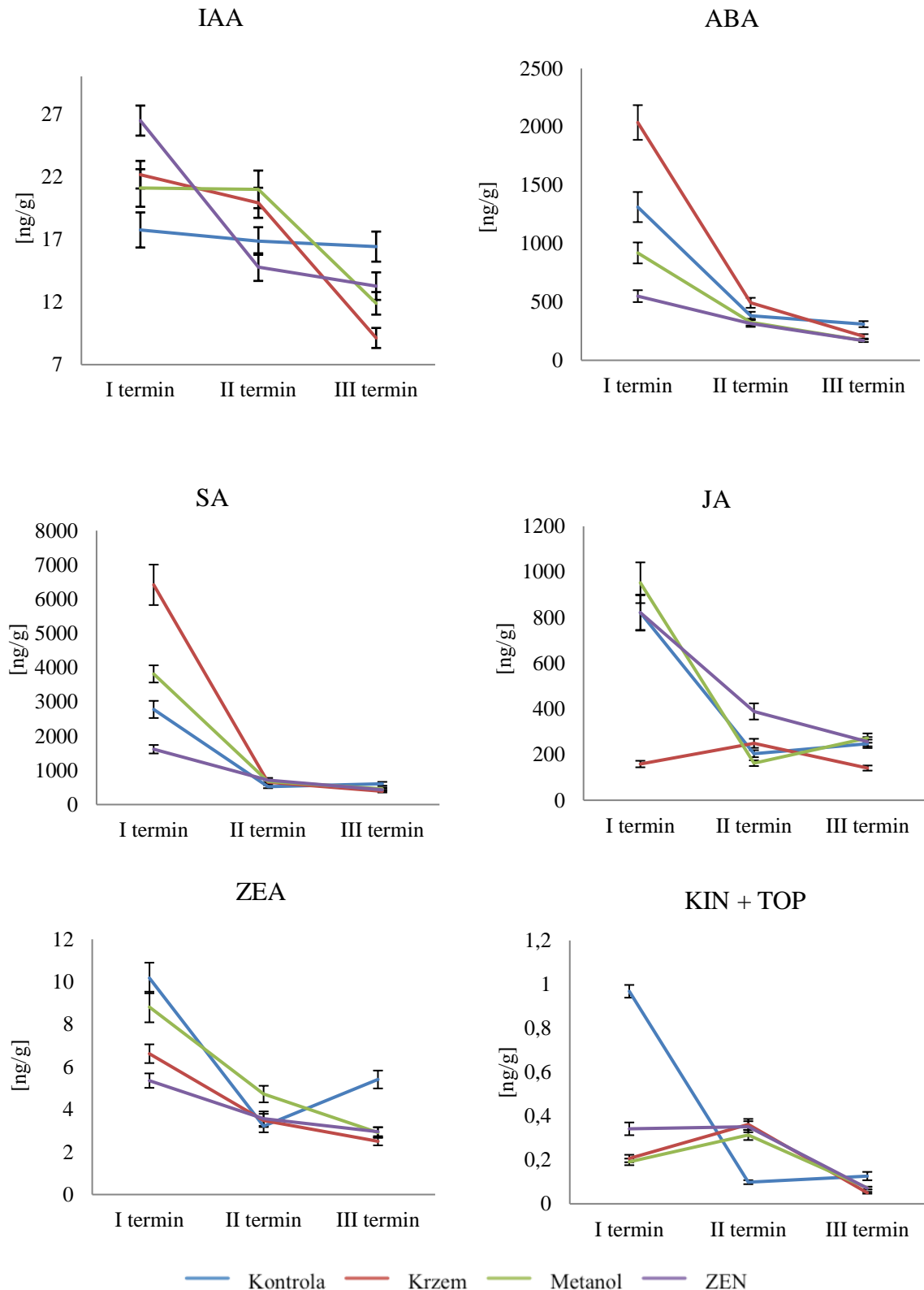
IAA – kwas indolilo-3-octowy; ABA – kwas abscysynowy; SA – kwas salicylowy ; JA – kwas jasmonowy; ZEA – zeatyna; KIN+TOP – kinetyna+topolina

Zawartość poszczególnych hormonów w liściach soi, analizowana w trzech terminach, zmieniała się specyficznie po aplikacji każdego ze stymulatorów (Wykres 1). Zawartość IAA zmniejszała się stopniowo wraz z upływem czasu po zastosowaniu wszystkich biostymulatorów. W roślinach kontrolnych poziom tego hormonu był stabilny. Również poziom ABA zmniejszał się wraz z upływem czasu po zastosowaniu biostymulatorów, jak również w roślinach kontrolnych. Istotne różnice zawartości tego hormonu po aplikacji różnymi stymulatorami obserwowano jedynie po tygodniu po wykonaniu oprysków. Najwyższą zawartość ABA w stosunku do kontroli i pozostałych stymulatorów w pierwszym terminie odnotowano po zastosowaniu krzemu. Metanol i zearalenon obniżyły w tym samym czasie poziom tego hormonu w stosunku do kontroli. Nie wykryto różnic w zawartości ABA w roślinach traktowanych wszystkimi stymulatorami i w roślinach kontrolnych w drugim i trzecim terminie. Podobny profil zmian zawartości SA obserwowano we wszystkich terminach. Poziom JA po pierwszym tygodniu był taki sam w roślinach kontrolnych, jak i w roślinach traktowanych metanolem i zearalenonem. W tym terminie najniższy poziom tego hormonu zarejestrowano po aplikacji krzemem. Jego zawartość nieznacznie wzrosła po dwóch tygodniach od czasu oprysku i zmniejszyła się po trzech tygodniach. W roślinach kontrolnych i traktowanych pozostałymi stymulatorami wykazano drastyczny spadek JA po drugim i trzecim tygodniu. Zawartość ZEA była najwyższa u wszystkich roślin w pierwszym terminie zbioru próbek do analiz, po czym zmniejszyła się wraz z upływem czasu z wyjątkiem roślin kontrolnych, w których poziom tego hormonu po trzech tygodniach

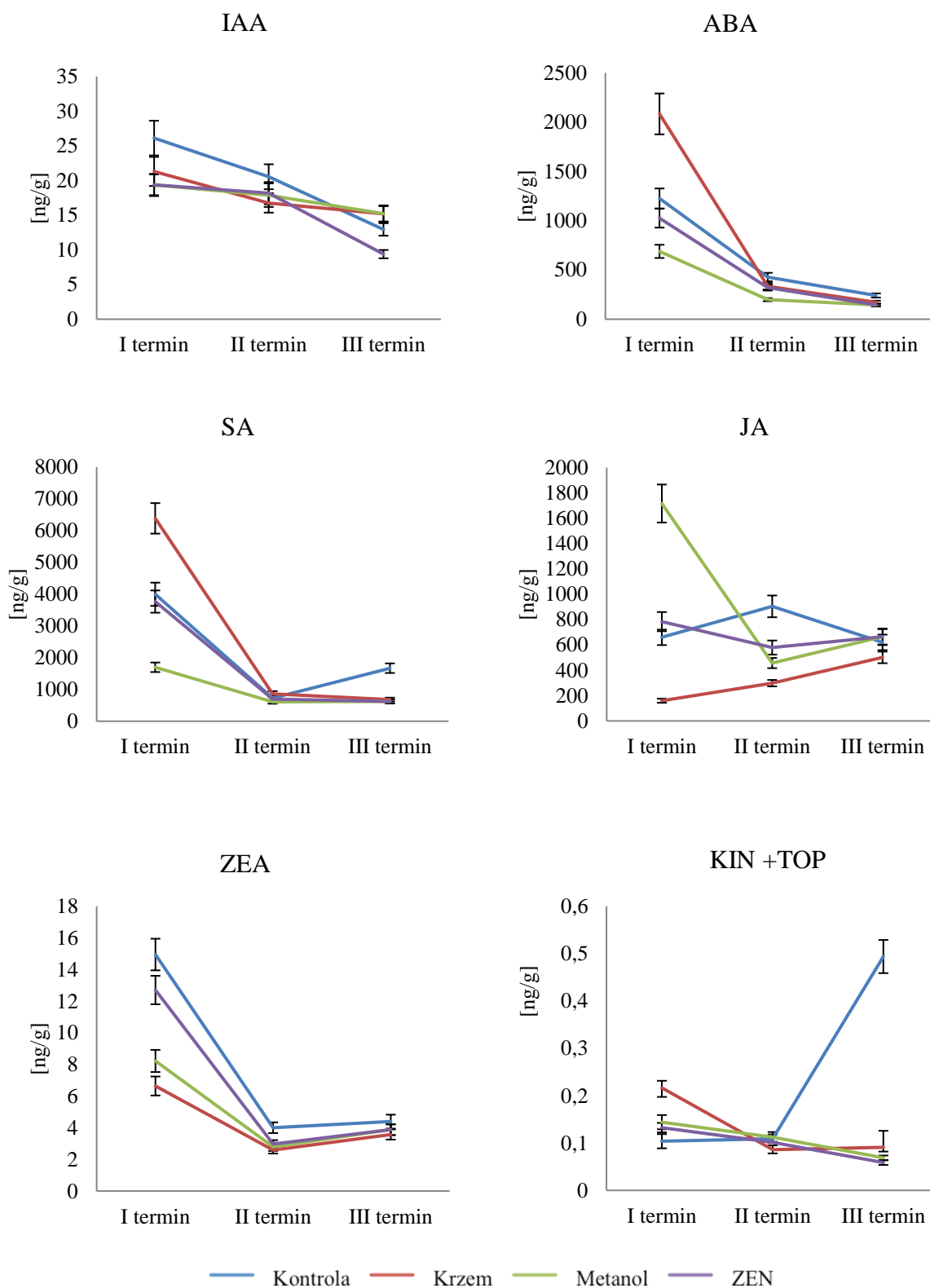
uprawy znacznie się zwiększył. Poziom pozostałych cytokinin (KIN+TOP) oznaczonych w liściach soi przebiegał podobnie pod wpływem wszystkich stymulatorów, przy czym najwyższą zawartość tych cytokinin oznaczono w roślinach kontrolnych w pierwszym terminie. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że największe zmiany w profilu hormonalnym nastąpiły pod wpływem krzemu w porównaniu do pozostałych biostymulatorów i roślin kontrolnych, przy czym zmiany te dotyczyły głównie ABA, SA, JA.

Zmiany w profilu hormonalnym w liściach odmiany „Abelina” analizowane w trzech terminach po aplikacji biostymulatorów przebiegały bardzo podobnie, jak w roślinach odmiany „Merlin”. Jediną istotną zmianę stwierdzono w profilu JA (Wykres 2). Najwyższy poziom tego hormonu, po pierwszym tygodniu po aplikacji biostymulatorami, zanotowano w liściach roślin traktowanych metanolem. Poziom tego hormonu w następnych terminach był dużo niższy pod wpływem tego stymulatora. Podobnie jak u odmiany „Merlin”, najniższą zawartość JA obserwowano po aplikacji krzemem. W przypadku odmiany „Abelina”, podobnie jak u odmiany „Merlin”, krzem najsilniej wpływał na poziom ABA, SA, JA, przy czym zwiększał zawartość ABA i SA w porównaniu do roślin traktowanych pozostałymi stymulatorami i do roślin kontrolnych, a zawartość JA zmniejszała się pod wpływem tego związku.

Wykres 1. Zawartość fitohormonów w liściach soi uprawnej odmiany „Merlin” zebranych w trzech terminach: I – jeden tydzień; II – dwa tygodnie; III – trzy tygodnie po aplikacji w czasie kwitnienia biostymulatorami: zearalenonem (ZEN), metanolem i krzemem. Przedstawione dane prezentują średnie ($n = 3$) \pm BS. IAA – kwas indolilo-3-octowy; ABA – kwas abscysynowy; SA – kwas salicylowy; JA – kwas jasmonowy; ZEA – zeatyna; KIN + TOP – kinetyna + topolina.



Wykres 2. Zawartość fitohormonów w liściach soi uprawnej odmiany „Abelina” zebranych w trzech terminach: I – jeden tydzień; II – dwa tygodnie; III – trzy tygodnie po aplikacji w czasie kwitnienia biostymulatorami: zearalenonem (ZEN), metanolem i krzemem. Przedstawione dane prezentują średnie ($n = 3$) \pm BS. IAA – kwas indolilo-3-octowy; ABA – kwas abscysynowy; SA – kwas salicylowy; JA – kwas jasmonowy; ZEA – zeatyna; KIN + TOP – kinetyna + topolina.



6.4. Doświadczenie 3. Wpływ zastosowanych szczepionek bakteryjnych na plonowanie soi uprawnej

Doświadczenie prowadzono na roślinach odmiany „Petrina” w roku 2018 r. w otwartym tunelu foliowym. Celem tego eksperymentu było zbadanie wpływu szczepionek bakteryjnych od trzech różnych producentów (Nitragina IUNG, Nitragina Biofood, Nitraza) na parametry kinetyki fluorescencji chlorofilu *a*, zawartość białka ogólnego w liściach, aktywność reduktazy azotanowej w liściach, stosunek poboru azotu z powietrza do azotu pobieranego z gleby oraz na parametry plonu soi. W przypadku analiz stosunku azotu pobieranego z powietrza do azotu pobieranego z gleby, równolegle uprawiano roślinę rukolę nienależącą do rodziny bobowatych (doświadczenie 3A).

W roślinach poddanych stresowi suszy analizowano dyskryminację węgla ^{13}C w liściach, strąkach i nasionach roślin jednej odmiany „Petrina”. Wskaźnik dyskryminacji ^{13}C świadczy o stopniu przymknięcia aparatów szparkowych, wymuszonym w reakcji obronnej roślin przed utratą wody i wykorzystaniu dwutlenku węgla w procesie fotosyntezy pochodzącego z tzw. recyklingu tj. fotooddychania lub oddychania (doświadczenie 3 B).

W 2019 r. prowadzono doświadczenie nad wpływem pięciu szczepionek bakteryjnych pochodzących od różnych producentów (Nitragina IUNG, Nitragina Biofood, Nitroflora Mycoflor, *Rhizobium* Bio-Gen, HiStick® Soy) na plonowanie nasion soi odmiany „Abelina”, Merlin” i „Petrina” w warunkach suszy glebowej. Stres suszy wprowadzono na początku kwitnienia i wynosił on docelowo 20% pojemności wodnej, natomiast rośliny kontrolne rosły przy 70% pojemności wodnej. Susza trwała trzy tygodnie. Po zbiorze roślin oceniano także liczbę brodawek na korzeniach (doświadczenie 3C).

6.4.1. Doświadczenie 3A. Analiza fizjologicznych i biochemicznych parametrów odmiany „Petrina” pod wpływem szczepionek bakteryjnych

Parametry kinetyki fluorescencji chlorofilu a

Rodzaj szczepionki wpływał istotnie na wszystkie analizowane parametry fluorescencji (Tabela 20).

Tabela 20. Analiza wariancji (ANOVA jednoczynnikowa) wpływu różnych szczepionek na parametry kinetyki fluorescencji chlorofilu *a*. Gwiazdkami zaznaczono istotność wpływu danego czynnika: * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$.

Czynnik	F_v/F_m	ABS/ CS_m	TR _o / CS_m	ET _o / CS_m	DI _o / CS_m	RC/ CS_m	PI
Szczepionka	***	ns	ns	**	*	*	***

Szczepionki wpływały specyficznie na wartości badanych parametrów fluorescencji chlorofilu *a* (Tabela 21). Największą maksymalną wydajność fotochemiczną PSII (F_v/F_m), strumień energii transportowanej poza Q_A (ET_o/ CS_m) i zagęszczenie aktywnych centrów reakcji PSII (RC/ CS_m) zanotowano w roślinach inokulowanych szczepionką Nitragina Biofood, natomiast najwyższą wartość wskaźnika funkcjonowania PSII (PI) obserwowano u roślin inokulowanych Nitraginą IUNG. Pozostałe szczepionki nie wpłynęły na ten parametr, który był podobny do wartości kontrolnych. Najniższą wielkość rozproszenia energii (DI_o/ CS_m) odnotowano w liściach roślin inokulowanych Nitraginą Biofood. Zastosowane szczepionki nie zmieniły absorbancji strumienia fotonów przez cząsteczki chlorofilu i centra reakcji (ABS/ CS_m) oraz strumień przechwytywanej energii w wyniku redukcji plastochinonu (TR_o/ CS_m) w stosunku do kontroli.

Tabela 21. Wpływ zastosowanych szczepionek bakteryjnych na parametry kinetyki fluorescencji chlorofilu *a* soi uprawnej odmiany „Petrina”. Średnie ($n = 20$) ± BS w kolumnach zaznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).

Szczepionka	F_v/F_m	ABS/ CS_m	TR _o / CS_m	ET _o / CS_m	DI _o / CS_m	RC/ CS_m	PI
Kontrola	0,775 ± 0,021 ^b	1466 ± 112 ^a	1137 ± 109 ^a	445 ± 34 ^b	328 ± 21 ^a	529 ± 46 ^b	1,160 ± 0,124 ^b
Nitragina Biofood	0,816 ± 0,045 ^a	1540 ± 125 ^a	1257 ± 114 ^a	645 ± 45 ^a	283 ± 18 ^b	671 ± 52 ^a	0,180 ± 0,024 ^c
Nitragina IUNG	0,784 ± 0,042 ^b	1486 ± 113 ^a	1167 ± 172 ^a	460 ± 32 ^b	319 ± 18 ^{ab}	521 ± 43 ^b	1,815 ± 0,142 ^a
Nitraza	0,768 ± 0,022 ^b	1428 ± 180 ^a	1098 ± 181 ^a	336 ± 23 ^c	330 ± 24 ^a	468 ± 34 ^b	0,157 ± 0,028 ^c

F_v/F_m – maksymalna wydajność fotochemiczna PSII; ABS/ CS_m – absorpcja energii w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię fotosyntetyzującej próbki; TR_o/ CS_m – strumień przechwytywanej energii w wyniku redukcji plastochinonu; ET_o/ CS_m – strumień energii transportowanej poza plastochinon Q_A; DI_o/ CS_m – wielkość rozproszenia energii; RC/ CS_m – zagęszczenie aktywnych centrów reakcji w PSII; PI – wartość wskaźnika funkcjonowania PSII.

Parametry plonu

Analiza wariancji wykazała istotny wpływ ($p < 0.05$) szczepionek na wysokość roślin, liczbę strąków, masę nasion i MTS, natomiast szczepionki nie decydowały o liczbie nasion (Tabela 22).

Tabela 22. Analiza wariancji (ANOVA jednoczynnikowa) wpływu szczepionki na wysokość roślin oraz parametry plonu soi odmiany „Petrina”. Gwiazdkami zaznaczono istotność wpływu danego czynnika: * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$; ns – nieistotny.

Czynnik	Wysokość roślin	Średnia liczba strąków/roślinę	Średnia liczba nasion/ roślinę	Średnia masa nasion/roślinę	Masa tysiąca nasion
Szczepionka	*	*	*	ns	***

Jedynie szczepionka Nitragina Biofood zwiększyła istotnie wysokość roślin soi odmiany „Petrina” w porównaniu do roślin nieinokulowanych i inokulowanych Nitraginą IUNG i Nitrazą (Tabela 23). Nitragina Biofood i Nitragina IUNG zwiększyły liczbę strąków zebranych z jednej rośliny. Najmniejszą MTN uzyskano po inokulacji Nitraginą Biofood, a największą z roślin kontrolnych i po inokulacji Nitraginą IUNG, aczkolwiek MTS z tego ostatniego traktowania nie różniła się od MTS z roślin inokulowanych Nitrazą.

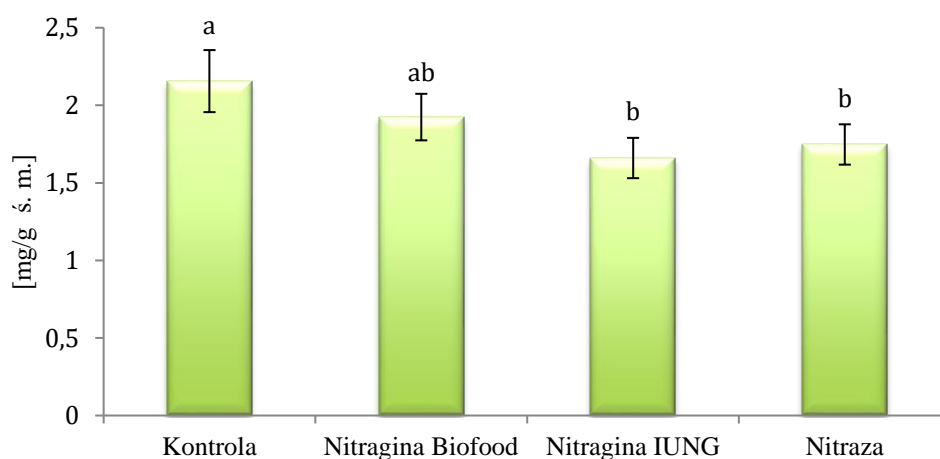
Tabela 23. Wpływ szczepionek bakteryjnych na wysokość roślin i parametry plonu soi uprawnej odmiany „Petrina”. Średnie ($n = 20$) \pm BS w kolumnach zaznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).

Szczepionka	Wysokość rośliny [cm]	Liczba strąków /roślinę	Liczba nasion /roślinę	Średnia masa Nasion[g] /roślinę	Masa tysiąca nasion [g]
Kontrola	50,4 \pm 2,5 ^b	12,5 \pm 1,1 ^b	31,6 \pm 2,5 ^{ab}	5,16 \pm 0,45 ^a	163,01 \pm 15,51 ^a
Nitragina Biofood	58,5 \pm 5,1 ^a	15,2 \pm 1,3 ^a	35,7 \pm 3,1 ^a	5,41 \pm 0,42 ^a	129,30 \pm 11,81 ^c
Nitragina IUNG	55,7 \pm 4,5 ^{ab}	15,4 \pm 1,4 ^a	31,3 \pm 3,2 ^{ab}	5,02 \pm 0,43 ^a	158,47 \pm 14,73 ^{ab}
Nitrazą	55,5 \pm 4,9 ^{ab}	12,6 \pm 1,1 ^b	28,7 \pm 1,5 ^b	4,59 \pm 0,39 ^a	152,16 \pm 14,92 ^b

Zawartość białka ogólnego w liściach

Analiza wariancji wykazała istotny wpływ zastosowanych szczepionek na zawartość białka w liściach soi odmiany „Petrina” ($p = 0,000$). Szczepionki obniżyły istotnie zawartość białka w liściach w przypadku roślin inokulowanych Nitraginą IUNG i Nitrazą (Wykres 3).

Wykres 3. Wpływ szczepionek bakteryjnych na zawartość białek rozpuszczalnych w liściach soi uprawnej odmiany „Petrina”. Średnie ($n = 20$) \pm BS zaznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).



W poniższych doświadczeniach dokonywano pomiarów na roślinach ośmiu obiektów: roślinach nieinokulowanych szczepionką (kontrola A), roślinach nieinokulowanych szczepionką rosnących w glebie z dodatkiem ^{15}N (kontrola B), roślinach inokulowanych trzema różnymi szczepionkami oraz roślinach inokulowanych różnymi trzema szczepionkami i rosnących w glebie z dodatkiem ^{15}N .

Wpływ izotopu ^{15}N aktywność reduktazy azotanowej i plonowanie

W celu oceny proporcji pomiędzy azotem pobieranym z gleby a azotem wiązany przez bakterie brodawkowe, do gleby dodawano siarczan amonu zawierający izotop „ciężkiego” azotu ^{15}N . W tej części doświadczenia analizowano najpierw wpływ tego izotopu na aktywność reduktazy azotanowej (EC 1.1.6.2) w współdziałaniu z trzema szczepionkami: Nitraginą Biofood, Nitraginą IUNG i Nitrazą oraz wpływ na plonowanie soi odmiany „Petrina”.

Analiza wariancji wykazała istotny wpływ zastosowanych szczepionek i izotopu ^{15}N , jak też interakcję tych dwóch czynników na aktywność reduktazy azotanowej w liściach odmiany „Petrina” (Tabela 24).

Tabela 24. Analiza wariancji (ANOVA dwuczynnikowa) wpływu szczepionki (SZ) i izotopu ^{15}N (I) na aktywność reduktazy azotanowej oraz parametry plonu soi odmiany „Petrina”. Gwiazdkami zaznaczono istotność wpływu danego czynnika: * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$; ns – nieistotny.

Czynnik	Aktywność reduktazy azotanowej	Średnia liczba strąków/roślinę	Średnia liczba nasion/ roślinę	Średnia masa nasion/roślinę [g]	Masa tysiąca nasion [g]
SZ	**	**	**	*	ns
I	**	*	**	*	ns
SZ x I	*	ns	*	ns	ns

Dodanie izotopu ^{15}N zwiększyło aktywność reduktazy azotanowej u roślin kontrolnych nieinokulowanych szczepionką oraz roślin inokulowanych Nitraginą IUNG (Wykres 4). W roślinach inokulowanych Nitraginą Biofood aktywność tego enzymu nie różniła się od aktywności w liściach roślin rosnących w glebie bez dodatku izotopu ^{15}N , natomiast dodanie tego izotopu zmniejszyło aktywność reduktazy azotanowej w roślinach inokulowanych Nitrazą Mycoflor. W przypadku roślin uprawianych w glebie bez dodania izotopu ^{15}N wszystkie zastosowane szczepionki zwiększyły aktywność tego enzymu w stosunku do roślin kontrolnych nieinokulowanych. Aktywność ta była najwyższa w przypadku roślin inokulowanych szczepionką Nitrazą Mycoflor.

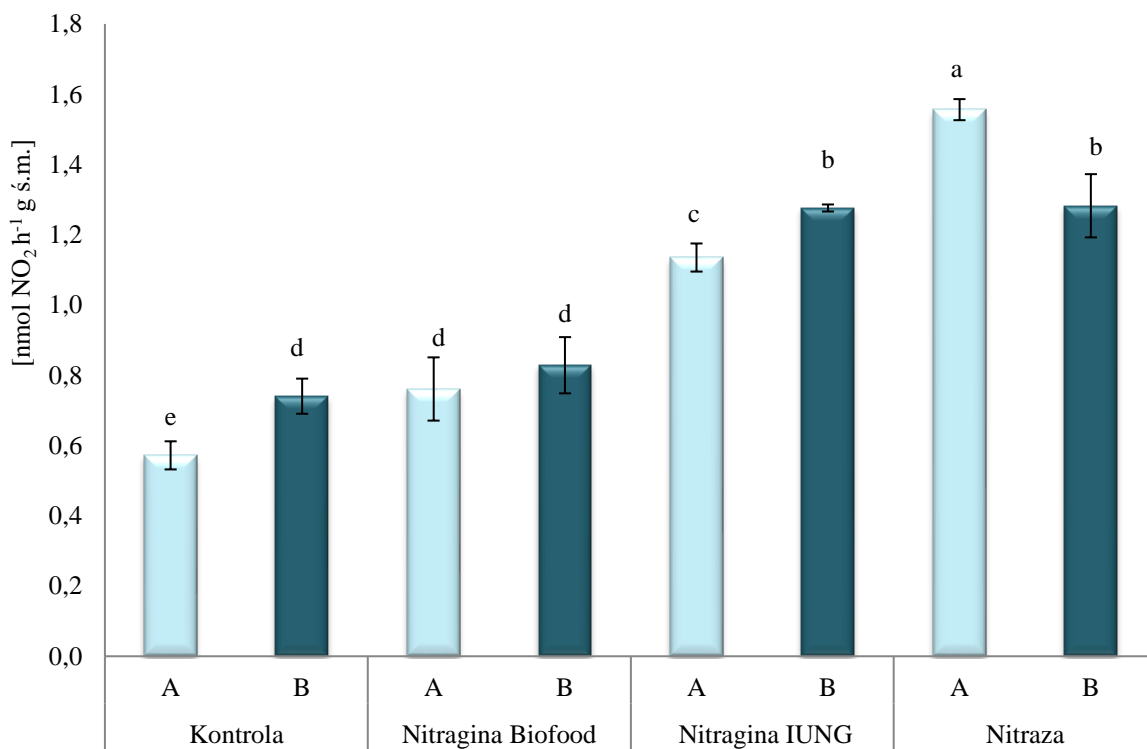
Analiza wariancji wykazała istotny wpływ szczepionki i izotopu na większość parametrów plonu z wyjątkiem MTS (Tabela 24). Jednocześnie, stwierdzono słabe współdziałanie tych dwóch czynników lub jego brak.

Po dodaniu ^{15}N do gleby stwierdzono wzrost liczby strąków tylko z roślin inokulowanych Nitrazą w stosunku do roślin rosnących w glebie bez izotopu (Tabela 25, Fot. 3). Najwięcej strąków otrzymano z roślin inokulowanych Nitraginą Biofood zarówno bez dodatku, jak i po dodaniu ciężkiego azotu (Fot. 4) oraz inokulowanych Nitraginą IUNG i po dodaniu ciężkiego azotu (Fot. 5).

Dodatek ^{15}N zwiększył liczbę i masę nasion zebranych z jednej rośliny po inokulacji Nitraginą IUNG i Nitrazą w porównaniu do plonu uzyskanego z roślin rosnących bez dodatku izotopu. Najwięcej nasion otrzymano z roślin bez ^{15}N inokulowanych Nitraginą Biofood.

Masa nasion nie zwiększyła się po dodaniu izotopu z wyjątkiem roślin inokulowanych Nitrazą. Masa tysiąca nasion niezależnie od zastosowanej szczepionki czy dodatku ciężkiego azotu była podobna dla wszystkich obiektów.

Wykres 4. Wpływ szczepionek bakteryjnych na aktywność reduktazy azotanowej w liściach soi uprawnej odmiany „Petrina”. Średnie ($n = 5$) \pm BS zaznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).



A – bez dodatku izotopu ¹⁵N, B – z dodatkiem izotopu ¹⁵N

Tabela 25. Wpływ zastosowanych szczepionek bakteryjnych oraz izotopu ¹⁵N na parametry plonu soi uprawnej odmiany „Petrina”. Średnie (n = 20) ± BS w wierszach zaznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; p < 0,05).

	Kontrola		Nitragina Biofood		Nitragina IUNG		Nitraza	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Średnia liczba strąków /roślinę	12,1 ± 0,7 ^b	13,4 ± 0,9 ^b	14,6 ± 0,9 ^a	15,1 ± 0,9 ^a	11,7 ± 0,7 ^b	13,4 ± 0,8 ^{ab}	10,5 ± 0,4 ^c	13,5 ± 0,3 ^b
Średnia liczba nasion/ roślinę	30,2 ± 2,5 ^b	33,3 ± 1,2 ^b	36,7 ± 0,9 ^a	35,0 ± 0,6 ^b	29,1 ± 1,5 ^c	33,5 ± 2,2 ^b	26,7 ± 2,1 ^c	32,8 ± 1,9 ^b
Średnia masa nasion [g]	4,81 ± 0,58 ^a	5,55 ± 0,31 ^a	5,72 ± 0,31 ^a	5,18 ± 0,22 ^a	4,62 ± 0,19 ^b	5,45 ± 0,29 ^a	4,11 ± 0,29 ^b	5,05 ± 0,44 ^a
Masa tysiąca nasion [g]	159,61 ± 12,32 ^a	166,58 ± 10,81 ^a	155,98 ± 11,24 ^a	148,88 ± 4,69 ^a	159,17 ± 12,32 ^a	162,89 ± 13,19 ^a	154,27 ± 11,19 ^a	154,11 ± 10,87 ^a

A – bez dodatku izotopu ¹⁵N, B – z dodatkiem izotopu w glebie.



Fot. 3. Roślina soi zwyczajnej po inokulacji szczepionką Nitraza oraz bez dodatku izotopu ^{15}N (A); z dodatkiem szczepionki i izotopu ^{15}N (B).



Fot. 4. Roślina soi zwyczajnej po inokulacji szczepionką Nitragina Biofood oraz bez dodatku izotopu ^{15}N (A); z dodatkiem szczepionki i izotopu ^{15}N (B)



Fot. 5. Roślina soi zwyczajnej po inokulacji szczepionką Nitragina IUNG oraz bez dodatku izotopu ^{15}N (A); z dodatkiem szczepionki i izotopu ^{15}N (B).

Określenie udziału azotu pobranego przez bakterie Bradyrhizobium japonicum w ogólnym pobieraniu azotu przez rośliny, przy wykorzystaniu siarczanu amonu o zwiększonym udziale izotopu ¹⁵N.

W Tabeli nr 26 i 27 przedstawiono procentowy udział azotu pobieranego z gleby i z powietrza w wyniku symbiozy z bakteriami. Badania wykonano na odmianie „Petrina” inokulowanej trzema szczepionkami. Największy udział wiązania azotu przez korzenie stwierdzono w liściach roślin kontrolnych, nieinokulowanych bakteriami oraz inokulowanych szczepionką Nitrazą (Tabela 26). Rośliny kontrolne nawiązywały symbiozę z bakteriami naturalnie występującymi w glebie. Jednocześnie te rośliny i rośliny inokulowane szczepionką Nitraza wykazały najniższy udział azotu atmosferycznego pobieranego przez bakterie, co by sugerowało mniejszą aktywność bakterii w tej szczepionce w porównaniu do bakterii w szczepionkach Nitragina Biofood i Nitragina IUNG. Te dwie szczepionki zawierały bakterie o podobnej aktywności asymilacji azotu z powietrza.

Udział azotu wiązanego przez bakterie stwierdzony w nasionach był zdecydowanie mniejszy niż w liściach (Tabela 27). Najmniej azotu atmosferycznego stwierdzono w nasionach roślin nieinokulowanych (kontrolnych) i jego udział w ogólnej puli pobranego azotu był dwukrotnie mniejszy w porównaniu do jego zawartości w nasionach pozostałych roślin inokulowanych. Największy udział azotu wiązanego przez bakterie wykryto w nasionach roślin inokulowanych szczepionką Nitraza. Biorąc jednak pod uwagę, że błąd pomiarowy tych oznaczeń wynosi 1%, należy przyjąć, że rośliny inokulowane wszystkimi zastosowanymi szczepionkami wykazały w nasionach taki sam udział azotu atmosferycznego i azotu pobieranego przez korzenie.

Tabela 26. Stosunek zawartości azotu pobranego z powietrza do azotu pobranego z gleby oznaczony w liściach soi odmiany „Petrina”.

Szczepionka	% azotu pobieranego z gleby	% azotu asymilowanego z powietrza
Kontrola	72,4	27,6
Nitragina Biofood	61,0	39,0
Nitragina IUNG	61,6	38,4
Nitraza	67,6	32,4

Tabela 27. Stosunek zawartości azotu pobranego z powietrza do azotu pobranego z gleby oznaczony w nasionach soi odmiany „Petrina”.

Szczepionka	% azotu pobieranego z gleby	% azotu asymilowanego z powietrza
Kontrola	96,7	3,3
Nitragina Biofood	93,7	6,3
Nitragina IUNG	93,5	6,5
Nitraza	93,0	7,0

Badania kalibracyjne wykonane na spektrometrze pomiarowym pokazują, że błąd standardowy pomiarów stężenia izotopów azotu wynosi ok. 1% wartości mierzonej.

6.4.2. Doświadczenie 3B. Łagodzące działanie szczepionek bakteryjnych na rośliny odmiany „Malaga”, „Merlin” i „Petrina” w warunkach suszy

W tym eksperymencie badano wpływ pięciu szczepionek od różnych producentów: Nitroflora Mycoflor, Nitragina IUNG, Nitragina Biofood, *Rhizobium* Bio-Gen i HiStick® Soy na plonowanie odmiany „Malaga”, „Merlin” i „Petrina” w warunkach suszy (20% ppw). Reakcję roślin na suszę analizowano na podstawie następujących parametrów: fluorescencji chlorofilu, aktywności reduktazy azotanowej, aktywności enzymów antyoksydacyjnych, wysokości roślin, świeżej i suchej masy części nadziemnej, relatywnej zawartości wody w liściach (RWC), liczby brodawek korzeniowych oraz parametrów plonu nasion. W tym doświadczeniu były dwie grupy roślin kontrolnych: optymalnie podlewanych w stosunku do roślin poddanych suszy, oraz rośliny nieinokulowane w stosunku do roślin inokulowanych szczepionkami od różnych producentów.

Parametry kinetyki fluorescencja chlorofilu a

Analiza wariancji wykazała, że szczepionki i susza nie wpływały na maksymalną wydajność fotochemiczną (F_v/F_m) u wszystkich badanych odmian (Tabela 28). Jedynie interakcja pomiędzy tymi czynnikami miała wpływ na ten parametr w liściach odmiany „Malaga”. Absorpcja energii w PSII zależała od zastosowanej szczepionki i traktowania w roślinach odmian „Malaga i „Merlin”, natomiast nie zmieniała się w roślinach odmiany „Petrina”. Strumień przechwytywanej energii (TR_o/CS_m) zmieniał się pod wpływem

zastosowanej szczepionki u odmiany „Malaga” i „Petrina”, natomiast susza wpływała na ten parametr tylko w roślinach u odmiany „Merlin”. Rodzaj szczepionki i susza wpływały na strumień energii transportowanej poza plastochinon Q_A (ET_o/CS_m) u odmiany „Malaga”, natomiast u odmiany „Merlin” oddziaływała na ten parametr tylko susza, a u odmiany „Petrina” tylko rodzaj szczepionki. Na rozproszenie energii (DI_o/CS_m) rodzaj szczepionki miał wpływ tylko u odmiany „Malaga”, a u odmiany „Merlin” tylko susza. Generalnie, rodzaj szczepionki i susza nie miały wpływu na zagęszczenie aktywnych centrów reakcji (RC/CS_m), ewentualnie współdziałanie obu tych czynników mogło mieć znaczenie u odmiany „Malaga” i „Petrina”. Traktowanie suszą nie wpłynęło na wskaźnik funkcjonowania PSII (PI) u żadnej z badanych odmian, natomiast znaczenie miał rodzaj zastosowanej szczepionki w przypadku odmiany „Malaga” i „Petrina”. U tych odmian zanotowano też wpływ współdziałania szczepionki i suszy na PI.

Tabela 28. Analiza wariancji (ANOVA dwuczynnikowa) wpływu szczepionek (SZ) i traktowania (T) tj. optymalnego nawadniania i suszy, na parametry kinetyki fluorescencji chlorofilu *a* roślin soi odmiany „Malaga”, „Merlin” i „Petrina”. Gwiazdkami zaznaczono istotność wpływu danego czynnika: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; ns – nieistotny.

Odmiana	Czynniki	F_v/F_m	ABS/CS_m	TR_o/CS_m	ET_o/CS_m	DI_o/CS_m	RC/CS_m	PI
Malaga	SZ	ns	***	***	*	*	ns	*
	T	ns	*	ns	*	ns	ns	ns
	SZ + T	*	**	*	**	**	**	**
Merlin	SZ	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
	T	ns	***	**	*	**	ns	ns
	SZ + T	ns	**	***	ns	ns	ns	ns
Petrina	SZ	ns	ns	**	*	ns	ns	**
	T	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	SZ + T	ns	ns	***	***	ns	**	***

F_v/F_m – maksymalna wydajność fotochemiczna PSII; ABS/CS_m – absorpcja energii w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię fotosyntetyzującej próbki; TR_o/CS_m – strumień przechwytywanej energii w wyniku redukcji plastochinonu; ET_o/CS_m – strumień energii transportowanej poza plastochinon Q_A ; DI_o/CS_m – wielkość rozproszenia energii; RC/CS_m – zagęszczenie aktywnych centrów reakcji w PSII; PI – wskaźnika funkcjonowania PSII.

Odmiana „Malaga”

F_v/F_m

Rośliny odmiany „Malaga” w warunkach optymalnego nawadniania inokulowane szczepionkami Nitroflora Mycoflor i *Rhizobium* Bio-Gen zwiększyły wartość maksymalnej wydajności fotochemicznej PSII (F_v/F_m) w porównaniu do kontroli oraz do roślin inokulowanych Nitraginą IUNG i Nitraginą Biofood (Tabela 29). W warunkach suszy parametr ten zwiększył się pod wpływem szczepionki Nitroflora Mycoflor i HiStick® Soy w porównaniu do roślin kontrolnych i inokulowanych pozostałymi szczepionkami. W większości przypadków w suszy wartość tego parametru była obniżona w porównaniu do wartości uzyskanych w warunkach optymalnego nawadniania. Wyjątkiem były rośliny inokulowane Nitraginą IUNG, u których wartość F_v/F_m się nie zmieniła pod wpływem suszy oraz roślin inokulowanych szczepionką HiStick® Soy, u których wartość F_v/F_m istotnie zwiększyła się w stosunku do roślin optymalnie nawadnianych.

ABS/CS_m

W warunkach optymalnego nawadniania absorpcja energii w przeliczeniu na powierzchnię fotosyntetyzującej próbki zmniejszyła się jedynie pod wpływem szczepionki Nitroflora i *Rhizobium* Bio-Gen w stosunku do kontroli (roślin nieinokulowanych), natomiast w warunkach suszy efekt ten był obserwowany pod wpływem Nitraginy Biofood, *Rhizobium* Bio-Gen i HiStick® Soy. W warunkach suszy w roślinach nieinokulowanych i inokulowanych szczepionką Nitroflora Mycoflor i *Rhizobium* Biogen parametr ten wzrósł w stosunku do roślin dobrze nawadnianych. W pozostałych przypadkach ilość zaabsorbowanej energii zmniejszyła się.

TR_o/CS_m

Strumień przechwytywanej energii w wyniku redukcji plastochinonu w roślinach dobrze nawadnianych zmniejszył się pod wpływem szczepionki Nitroflora Mycoflor w porównaniu do roślin nieinokulowanych. Pozostałe szczepionki nie wpłynęły na zmianę tego parametru. Pod wpływem suszy wartość TR_o/CS_m była niższa jedynie w roślinach inokulowanych szczepionką *Rhizobium* Bio-Gen i HiStick® Soy, porównując do wartości kontrolnych – roślin nieinokulowanych. Wartość tego parametru wzrosła istotnie w warunkach suszy w roślinach nieinokulowanych i w roślinach inokulowanych szczepionką

Nitroflora Mycoflor. W pozostałych przypadkach szczepionki obniżyły wartość tego parametru w porównaniu do roślin dobrze nawadnianych.

ET_o/CS_m

W roślinach dobrze nawadnianych (kontrolnych) strumień energii transportowanej poza Q_A zwiększył się pod wpływem Nitraginy IUNG, Nitroflory Mycoflor i *Rhizobium Bio-Gen* w porównaniu do wartości zarejestrowanej u roślin nieinokulowanych. Pod wpływem szczepionek Nitroflora Mycoflor, *Rhizobium Bio-Gen* i HiStick® Soy w suszy zwiększyła się wartość tego parametru, natomiast w roślinach inokulowanych Nitraginą IUNG i Nitraginą Biofood parametr ten był istotnie niższy.

DI_o/CS_m

Rosliny dobrze nawadniane wykazały mniej energii rozproszonej pod wpływem Nitroflory Mycoflor, *Rhizobium Bio-Gen* i HiStick® Soy w porównaniu do roślin nieinokulowanych. W suszy wszystkie zastosowane szczepionki istotnie obniżyły stopień rozpraszania energii w PSII w porównaniu do wartości zanotowanej u roślin nieinokulowanych. W ramach roślin inokulowanych tą samą szczepionką susza zwiększyła ilość rozpraszanej energii w przypadku roślin traktowanych *Rhizobium Bio-Gen* i Nitroflorą Mycoflor. Również rośliny kontrolne tj. nieinokulowane, pod wpływem suszy wykazały istotnie większy stopień rozproszenia energii. W pozostałych przypadkach w suszy odnotowano niższą wartość tego parametru.

RC/CS_m

Szczepionki i susza nie wpłynęły na zagęszczenie aktywnych centrów reakcji.

PI

W warunkach optymalnego nawadniania najwyższą wartość wskaźnika funkcjonowania PSII zanotowano w roślinach inokulowanych szczepionką Nitroflora Mycoflor. Rośliny inokulowane szczepionką Nitragina IUNG i Nitragina Biofood wykazały obniżoną wartość tego parametru, zaś u inokulowanych szczepionką *Rhizobium Bio-Gen* i HiStick® Soy wskaźnik PI był większy niż w roślinach nieinokulowanych, aczkolwiek

istotnie mniejszy niż w przypadku roślin traktowanych Nitroflorą Mycoflor. We wszystkich przypadkach susza istotnie zmniejszyła wskaźnik funkcjonowania PSII.

Tabela 29. Wpływ wybranych szczepionek bakteryjnych oraz suszy na parametry kinetyki fluorescencji chlorofilu *a* soi uprawnej odmiany „Malaga”. Średnie (n = 10) ± BS zaznaczone w kolumnach tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; p < 0,05). Dużymi literami zaznaczono różnice pomiędzy średnimi z roślin optymalnie nawadnianych (A); małymi literami zaznaczono różnice pomiędzy średnimi uzyskanymi z roślin w warunkach suszy (B). Gwiazdkami zaznaczono istotne różnice pomiędzy średnimi dla każdego obiektu pomiędzy danymi uzyskanymi w warunkach optymalnego nawadniania i suszy: * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001; ns – statystycznie nieistotne; test t-Studenta.

Szczepionka		F _v /F _m	ABS/CS _m	TR _o /CS _m	ET _o /CS _m	DI _o /CS _m	RC/CS _m	PI
Kontrola	A	0,611 ± 0,058 ^B	412 ± 43 ^A	249 ± 18 ^A	60 ± 5 ^C	163 ± 12 ^A	104 ± 9 ^A	0,454 ± 0,054 ^D
	B	0,574 ± 0,065 ^{c***}	470 ± 42 ^{a***}	267 ± 21 ^{a*}	61 ± 5 ^{c ns}	202 ± 18 ^{a***}	92 ± 8 ^{a ns}	0,094 ± 0,008 ^{e***}
Nitragina Biofood	A	0,637 ± 0,452 ^B	397 ± 32 ^A	243 ± 21 ^A	59 ± 4 ^C	153 ± 16 ^A	99 ± 8 ^A	0,279 ± 0,032 ^E
	B	0,615 ± 0,067 ^{c*}	367 ± 32 ^{b***}	222 ± 19 ^{ab*}	57 ± 5 ^{d*}	145 ± 15 ^{b*}	89 ± 9 ^{a ns}	0,193 ± 0,021 ^{d**}
Nitragina IUNG	A	0,618 ± 0,055 ^C	434 ± 35 ^A	265 ± 20 ^A	73 ± 7 ^B	169 ± 18 ^A	111 ± 10 ^A	0,192 ± 0,021 ^F
	B	0,617 ± 0,058 ^{c ns}	391 ± 32 ^{a***}	237 ± 21 ^{a*}	45 ± 4 ^{d***}	154 ± 16 ^{b*}	100 ± 12 ^{a ns}	0,152 ± 0,009 ^{f**}
Nitroflora Mycoflor	A	0,753 ± 0,068 ^A	271 ± 21 ^B	203 ± 18 ^B	110 ± 9 ^A	68 ± 7 ^C	105 ± 9 ^A	5,187 ± 0,187 ^A
	B	0,733 ± 0,068 ^{a*}	413 ± 38 ^{a***}	303 ± 28 ^{a***}	175 ± 18 ^{a***}	109 ± 10 ^{c***}	97 ± 10 ^a	0,427 ± 0,048 ^{b***}
HiStick® Soy	A	0,663 ± 0,078 ^{AB}	366 ± 30 ^A	241 ± 18 ^A	52 ± 4 ^C	125 ± 10 ^B	101 ± 11 ^A	1,545 ± 0,135 ^B
	B	0,754 ± 0,068 ^{a***}	271 ± 23 ^{c***}	203 ± 20 ^{b*}	109 ± 9 ^{a**}	67 ± 5 ^{d***}	107 ± 9 ^{a ns}	1,153 ± 0,193 ^{a***}
<i>Rhizobium</i> Bio-Gen	A	0,743 ± 0,058 ^A	305 ± 28 ^B	223 ± 19 ^{AB}	85 ± 8 ^B	81 ± 7 ^C	99 ± 10 ^A	0,615 ± 0,058 ^C
	B	0,635 ± 0,055 ^{b***}	351 ± 32 ^{b**}	213 ± 19 ^{b*}	82 ± 7 ^{b ns}	138 ± 12 ^{b**}	96 ± 10 ^{a ns}	0,277 ± 0,035 ^{c***}

A – optymalne nawadnianie; B – susza; F_v/F_m – maksymalna wydajność fotochemiczna PSII; ABS/CS_m – absorpcja energii w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię fotosyntetyzującej próbki; TR_o/CS_m – strumień przechwytywanej energii w wyniku redukcji plastochinonu; ET_o/CS_m – strumień energii transportowanej poza plastochinon Q_A; DI_o/CS_m – wielkość rozproszenia energii; RC/CS_m – zagęszczenie aktywnych centrów reakcji w PSII; PI – wskaźnika funkcjonowania PSII.

Odmiana „Merlin”

F_v/F_m

Maksymalna wydajność fotochemiczna PSII nie zmieniła się pod wpływem inokulacji szczepionkami w roślinach dobrze nawadnianych w porównaniu do roślin nieinokulowanych (Tabela 30). W suszy parametr ten zmniejszył się jedynie pod wpływem Nitraginy IUNG w porównaniu do roślin kontrolnych. W roślinach nieinokulowanych oraz pod wpływem Nitraginy IUNG i Nitraginy Biofood susza zmniejszyła F_v/F_m , natomiast w roślinach inokulowanych Nitroflorą Mycoflor i HiStick® Soy wartość F_v/F_m była taka sama w roślinach optymalnie podlewanych i poddanych suszy. Jedynie w roślinach inokulowanych szczepionką *Rhizobium* Bio-Gen wartość F_v/F_m wzrosła w warunkach suszy w stosunku do roślin optymalnie podlewanych.

ABS/CS_m

W warunkach optymalnego podlewania wartość absorpcji energii w roślinach inokulowanych szczepionkami Nitragina IUNG i *Rhizobium* Bio-Gen zmniejszyła się w porównaniu do roślin nieinokulowanych, natomiast pod wpływem szczepionki HiStick® Soy wartość ta była największa. W suszy wartość ABS/CS_m wzrosła w roślinach nieinokulowanych i roślinach inokulowanych Nitraginą IUNG i Nitraginą Biofood. W pozostałych przypadkach wartość ta była mniejsza w porównaniu do wartości zanotowanych w roślinach dobrze podlewanych.

TR_o/CS_m

W warunkach kontrolnych i w suszy nie obserwowano zmian w strumieniu przechwytywanej energii w wyniku redukcji plastochinonu, zarówno w roślinach nieinokulowanych, jak i inokulowanych szczepionkami od różnych producentów.

ET_o/CS_m

W roślinach dobrze nawadnianych istotne obniżenie wartości transportowanej poza Q_A zanotowano pod wpływem Nitraginy Biofood i HiStick® Soy w stosunku roślin nieinokulowanych. W suszy zmniejszenie strumienia energii obserwowano u roślin inokulowanych Nitraginą IUNG i Nitraginą Biofood, natomiast w pozostałych przypadkach szczepionki zwiększyły tę wartość w porównaniu do roślin kontrolnych – nieinokulowanych.

W tych roślinach oraz inokulowanych Nitraginą IUNG i Nitraginą Biofood w suszy wartość tego parametru zmniejszyła się w porównaniu do roślin dobrze nawadnianych. Z kolei w roślinach inokulowanych szczepionką *Rhizobium* Bio-Gen zanotowano w suszy istotnie wyższą wartość ET_o/CS_m w porównaniu do tej wartości w roślinach optymalnie nawadnianych.

DI_o/CS_m

Wzrost energii rozproszonej w warunkach optymalnego podlewania nastąpił po inokulacji roślin szczepionkami Nitraginą Biofood i HiStick® Soy w stosunku do roślin kontrolnych. Obniżenie tego parametru notowano po inokulacji Nitraginą IUNG. W suszy największe rozproszenie energii obserwowano u roślin inokulowanych Nitraginą IUNG w porównaniu do roślin nieinokulowanych. Parametr ten wzrósł również w roślinach inokulowanych Nitraginą Biofood. Rozproszenie energii w suszy wzrosło praktycznie u wszystkich roślin z wyjątkiem roślin inokulowanych szczepionką Nitroflora Mycoflor.

RC/CS_m

Susza nie wpłynęła istotnie na zmianę tego parametru u wszystkich badanych roślin, porównując do warunków optymalnego podlewania. Również aplikacja szczepionkami w warunkach optymalnego podlewania, jak i w suszy nie zmieniła zagęszczenia aktywnych centrów reakcji PSII.

PI

W warunkach optymalnego podlewania najwyższą wartość wskaźnika PSII zanotowano u roślin inokulowanych szczepionką Nitroflora. Szczepionki Nitragina IUNG, *Rhizobium* Bio-Gen i HiStick® Soy istotnie zwiększyły wartość tego wskaźnika w porównaniu do roślin nieinokulowanych. W warunkach suszy najwyższą wartość PI obserwowano w roślinach inokulowanych szczepionką *Rhizobium* Bio-Gen, a następnie u roślin inokulowanych szczepionką Nitroflora Mycoflor. Najniższą z kolei wartość PI w tych warunkach zarejestrowano w roślinach inokulowanych Nitraginą IUNG. U wszystkich roślin susza zdecydowanie obniżyła wartość tego wskaźnika w stosunku do roślin optymalnie podlewanych.

Tabela 30. Wpływ wybranych szczepionek bakteryjnych oraz suszy na parametry kinetyki fluorescencji chlorofilu *a* soi uprawnej odmiany „Merlin”. Średnie ($n = 10$) \pm BS zaznaczone w kolumnach tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$). Dużymi literami zaznaczono różnice pomiędzy średnimi z roślin optymalnie nawadnianych (A); małymi literami zaznaczono różnice pomiędzy średnimi uzyskanymi z roślin w warunkach suszy (B). Gwiazdkami zaznaczono istotne różnice pomiędzy średnimi dla każdego obiektu pomiędzy danymi uzyskanymi w warunkach optymalnego nawadniania i suszy: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; ns – statystycznie nieistotne; test t-Studenta.

Szczepionka		F_v/F_m	ABS/ CS_m	TR _o / CS_m	ET _o / CS_m	DI _o / CS_m	RC/ CS_m	PI
Kontrola	A	0,720 \pm 0,068 ^A	340 \pm 35 ^B	242 \pm 19 ^A	104 \pm 9 ^A	98 \pm 9 ^C	110 \pm 9 ^A	1,169 \pm 0,180 ^C
	B	0,624 \pm 0,055 ^{a ***}	427 \pm 45 ^{ab **}	266 \pm 20 ^{a *}	66 \pm 5 ^{b ***}	161 \pm 15 ^{b ***}	110 \pm 10 ^{a ns}	0,156 \pm 0,012 ^{e ****}
Nitragina	A	0,653 \pm 0,071 ^A	366 \pm 30 ^B	232 \pm 18 ^A	76 \pm 8 ^B	133 \pm 12 ^B	103 \pm 11 ^A	0,546 \pm 0,045 ^D
Biofood	B	0,619 \pm 0,059 ^{a *}	426 \pm 38 ^{ab ****}	253 \pm 23 ^{a *}	50 \pm 3 ^{c *}	172 \pm 18 ^{b ***}	105 \pm 10 ^{a ns}	0,244 \pm 0,020 ^{d ****}
Nitragina	A	0,711 \pm 0,075 ^A	288 \pm 24 ^C	203 \pm 10 ^A	120 \pm 10 ^A	85 \pm 9 ^D	98 \pm 8 ^A	2,006 \pm 0,023 ^B
IUNG	B	0,562 \pm 0,038 ^{b ****}	540 \pm 55 ^{a ****}	301 \pm 28 ^{a ****}	39 \pm 3 ^{d **}	238 \pm 24 ^{a **}	124 \pm 10 ^{a ns}	0,050 \pm 0,005 ^{f ****}
Nitroflora	A	0,705 \pm 0,065 ^A	374 \pm 31 ^B	259 \pm 26 ^A	138 \pm 10 ^A	114 \pm 10 ^C	106 \pm 9 ^A	5,078 \pm 0,056 ^A
Mycoflor	B	0,705 \pm 0,068 ^{a ns}	328 \pm 25 ^{bc ns}	222 \pm 17 ^{a ns}	88 \pm 7 ^{a ns}	105 \pm 9 ^{c ns}	98 \pm 8 ^{a ns}	1,262 \pm 0,135 ^{b ****}
HiStick [®] Soy	A	0,657 \pm 0,045 ^A	414 \pm 38 ^A	258 \pm 23 ^A	76 \pm 6 ^B	155 \pm 12 ^A	105 \pm 11 ^A	2,167 \pm 0,24 ^B
	B	0,657 \pm 0,056 ^{a ns}	379 \pm 34 ^{a **}	215 \pm 17 ^{a **}	75 \pm 6 ^{b ns}	164 \pm 12 ^{b **}	100 \pm 8 ^{a ns}	0,697 \pm 0,054 ^{c ****}
<i>Rhizobium</i>	A	0,705 \pm 0,067 ^A	338 \pm 30 ^B	224 \pm 21 ^A	90 \pm 9 ^A	114 \pm 10 ^C	105 \pm 9 ^A	2,066 \pm 0,25 ^B
Bio-Gen	B	0,747 \pm 0,072 ^{a **}	295 \pm 22 ^{b **}	216 \pm 22 ^{a **}	111 \pm 10 ^{a **}	78 \pm 7 ^{d **}	100 \pm 12 ^{a ns}	1,581 \pm 0,16 ^{a ****}

A – optymalne nawadnianie; B – susza; F_v/F_m – maksymalna wydajność fotochemiczna PSII; ABS/ CS_m – absorpcja energii w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię fotosyntetyzującej próbki; TR_o/ CS_m – strumień przechwytywanej energii w wyniku redukcji plastochinonu; ET_o/ CS_m – strumień energii transportowanej poza plastochinon Q_A; DI_o/ CS_m – wielkość rozproszenia energii; RC/ CS_m – zagęszczenie aktywnych centrów reakcji w PSII; PI – wskaźnik funkcjonowania PSII.

Odmiana „Petrina”

F_v/F_m

W roślinach optymalnie podlewanych i w suszy maksymalna wydajność fotochemiczna PSII nie zmieniała się pod wpływem zastosowanych szczepionek (Tabela 31). W roślinach kontrolnych oraz inokulowanych szczepionkami Nitragina IUNG, Nitragina Biofood i Nitroflora Mycoflor w warunkach suszy wartość tego parametru była istotnie mniejsza, natomiast w roślinach inokulowanych szczepionkami *Rhizobium* Bio-Gen i HiStick[®] Soy wartość F_v/F_m wzrosła.

ABS/CS_m

W warunkach optymalnego podlewania, jak i w suszy aplikowanie szczepionek nie zmieniło wartości ABS/CS_m . Jedynym wyjątkiem były rośliny inokulowane szczepionką *Rhizobium* Bio-Gen, u których ilość tej energii była zaabsorbowana w mniejszym stopniu w porównaniu do roślin nieinokulowanych. Pod wpływem suszy wartość parametru ABS/CS_m wzrosła u roślin nieinokulowanych, jak i inokulowanych Nitraginą IUNG i Nitraginą Biofood. W pozostałych przypadkach wartość ta się zmniejszyła.

TR_o/CS_m

Brak reakcji na szczepionki obserwowano u tej odmiany również pod względem strumienia przechwytywanej energii w wyniku redukcji plastochinonu zarówno w warunkach optymalnego podlewania, jak i w suszy. Susza jednak wpłynęła na ilość tej energii w porównaniu do roślin optymalnie nawadnianych u roślin nieinokulowanych i inokulowanych Nitraginą IUNG, Nitraginą Biofood i HiStick[®] Soy. W pozostałych roślin pod wpływem suszy wartość tego parametru się zmniejszyła.

ET_o/CS_m

W roślinach nawadnianych szczepionki z wyjątkiem *Rhizobium* Bio-Gen zwiększyły strumień energii transportowanej poza Q_A w porównaniu do roślin nieinokulowanych, natomiast w suszy największą wartość tego parametru zanotowano u roślin inokulowanych tą właśnie szczepionką. W suszy wartość tego parametru zmniejszyła się istotnie w roślinach inokulowanych Nitrąginą IUNG, Nitrąginą Biofood, Nitroflorą Mycoflor i HiStick[®] Soy.

DI_o/CS_m

W roślinach optymalnie nawadnianych największą energię rozproszoną zanotowano w roślinach inokulowanych szczepionką HiStick[®] Soy. W pozostałych przypadkach wartość tego parametru nie różniła się od wartości zanotowanej w roślinach kontrolnych. W suszy najwięcej energii rozproszonej obserwowano w roślinach kontrolnych tj. nieinokulowanych, a najmniejszą w roślinach inokulowanych szczepionką *Rhizobium* Bio-Gen. Susza zwiększyła rozproszenie energii u wszystkich roślin z wyjątkiem inokulowanych szczepionkami *Rhizobium* Bio-Gen i HiStick[®] Soy.

RC/CS_m

Podobnie jak u poprzednich odmian, ani szczepionki ani susza nie wpłynęły na zagęszczenie aktywnych centrów reakcji.

PI

W warunkach dobrego uwodnienia najwyższą wartość wskaźnika funkcjonowania PSII zanotowano u roślin inokulowanych Nitrąginą IUNG i Nitrąginą Biofood. W pozostałych przypadkach, zastosowanie szczepionki zwiększyło wartość tego parametru w porównaniu do roślin nieinokulowanych. Susza obniżyła wartość PI u wszystkich roślin z wyjątkiem szczepionki *Rhizobium* Bio-Gen.

Tabela 31. Wpływ wybranych szczepionek bakteryjnych oraz suszy na parametry kinetyki fluorescencji chlorofilu *a* soi uprawnej odmiany „Petrina”. Średnie ($n = 10$) \pm BS zaznaczone w kolumnach tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$). Dużymi literami zaznaczono różnice pomiędzy średnimi z roślin optymalnie nawadnianych (A); małymi literami zaznaczono różnice pomiędzy średnimi uzyskanymi z roślin w warunkach suszy (B). Gwiazdkami zaznaczono istotne różnice pomiędzy średnimi dla każdego obiektu pomiędzy danymi uzyskanymi w warunkach optymalnego nawadniania i suszy: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; ns – statystycznie nieistotne; test t-Studenta.

Szczepionka		F_v/F_m	ABS/CS_m	TR_o/CS_m	ET_o/CS_m	DI_o/CS_m	RC/CS_m	PI
Kontrola	A	$0,662 \pm 0,054^A$	356 ± 30^A	233 ± 19^A	56 ± 4^C	123 ± 13^A	99 ± 8^A	$0,218 \pm 0,028^E$
	B	$0,603 \pm 0,052^{a***}$	$457 \pm 40^{a***}$	$257 \pm 24^{a***}$	54 ± 5^b	$199 \pm 19^{a***}$	$103 \pm 10^{a\ ns}$	$0,193 \pm 0,023^{c***}$
Nitragina	A	$0,718 \pm 0,069^A$	352 ± 37^A	246 ± 19^A	74 ± 6^B	105 ± 18^A	115 ± 11^A	$0,814 \pm 0,075^B$
	Biofood	$0,634 \pm 0,058^{a***}$	$415 \pm 42^{a***}$	$259 \pm 26^{a*}$	$33 \pm 3^{d*}$	$155 \pm 14^{b***}$	$102 \pm 9^{a\ ns}$	$0,064 \pm 0,005^{e***}$
Nitragina	A	$0,712 \pm 0,068^A$	330 ± 25^A	228 ± 21^A	89 ± 8^A	102 ± 11^A	108 ± 9^A	$1,428 \pm 0,123^A$
	IUNG	$0,634 \pm 0,055^{a***}$	$394 \pm 42^{a***}$	$245 \pm 20^{a***}$	$44 \pm 3^{c***}$	$148 \pm 13^{b***}$	$104 \pm 12^{a\ ns}$	$0,129 \pm 0,013^{d***}$
Nitroflora	A	$0,686 \pm 0,079^A$	361 ± 34^A	246 ± 22^A	69 ± 5^B	114 ± 12^A	107 ± 10^A	$0,355 \pm 0,028^D$
	B	$0,616 \pm 0,055^{a***}$	$356 \pm 32^{a*}$	$207 \pm 20^{a***}$	$47 \pm 5^{bc*}$	$149 \pm 14^{b***}$	$85 \pm 7^{b\ ns}$	$0,241 \pm 0,022^{b***}$
HiStick® Soy	A	$0,657 \pm 0,054^A$	379 ± 32^A	215 ± 21^A	75 ± 7^B	164 ± 17^B	100 ± 9^A	$0,697 \pm 0,072^C$
	B	$0,670 \pm 0,082^{a*}$	$348 \pm 36^{a***}$	$233 \pm 24^{a*}$	$57 \pm 5^{b*}$	$115 \pm 10^{a***}$	$102 \pm 10^{a\ ns}$	$0,210 \pm 0,018^{c***}$
<i>Rhizobium</i>	A	$0,673 \pm 0,065^A$	363 ± 34^A	240 ± 24^A	57 ± 6^C	122 ± 12^A	101 ± 9^A	$0,259 \pm 0,018^E$
	Bio-Gen	$0,778 \pm 0,071^{a***}$	$261 \pm 23^{b*}$	$202 \pm 19^{a***}$	$120 \pm 13^{a***}$	$58 \pm 5^{c***}$	$106 \pm 10^{a\ ns}$	$0,615 \pm 0,056^{a***}$

A – optymalne nawadnianie; B – susza; F_v/F_m – maksymalna wydajność fotochemiczna PSII; ABS/CS_m – absorpcja energii w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię fotosyntetyzującej próbki; TR_o/CS_m – strumień przechwytywanej energii w wyniku redukcji plastochinonu; ET_o/CS_m – strumień energii transportowanej poza plastochinon Q_A ; DI_o/CS_m – wielkość rozproszenia energii; RC/CS_m – zagęszczenie aktywnych centrów reakcji w PSII; PI – wskaźnik funkcjonowania PSII.

Aktywność reduktazy azotanowej

Zastosowane szczepionki i susza wpłynęły istotnie na aktywność reduktazy azotanowej u wszystkich badanych odmian (Tabela 32). Interesującym faktem jest brak istotnego współdziałania tych dwóch czynników na aktywność tego enzymu.

Tabela 32. Analiza wariancji (ANOVA dwuczynnikowa) wpływu szczepionek (SZ) i traktowania tj. optymalnego nawadniania i suszy (T) na aktywność reduktazy azotanowej w liściach roślin soi odmiany „Malaga”, „Merlin”, i „Petrina”. Gwiazdkami zaznaczono istotność wpływu danego czynnika: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; ns – nieistotny.

Czynnik	Malaga	Merlin	Petrina
SZ	***	***	***
T	***	***	***
SZ + T	ns	ns	ns

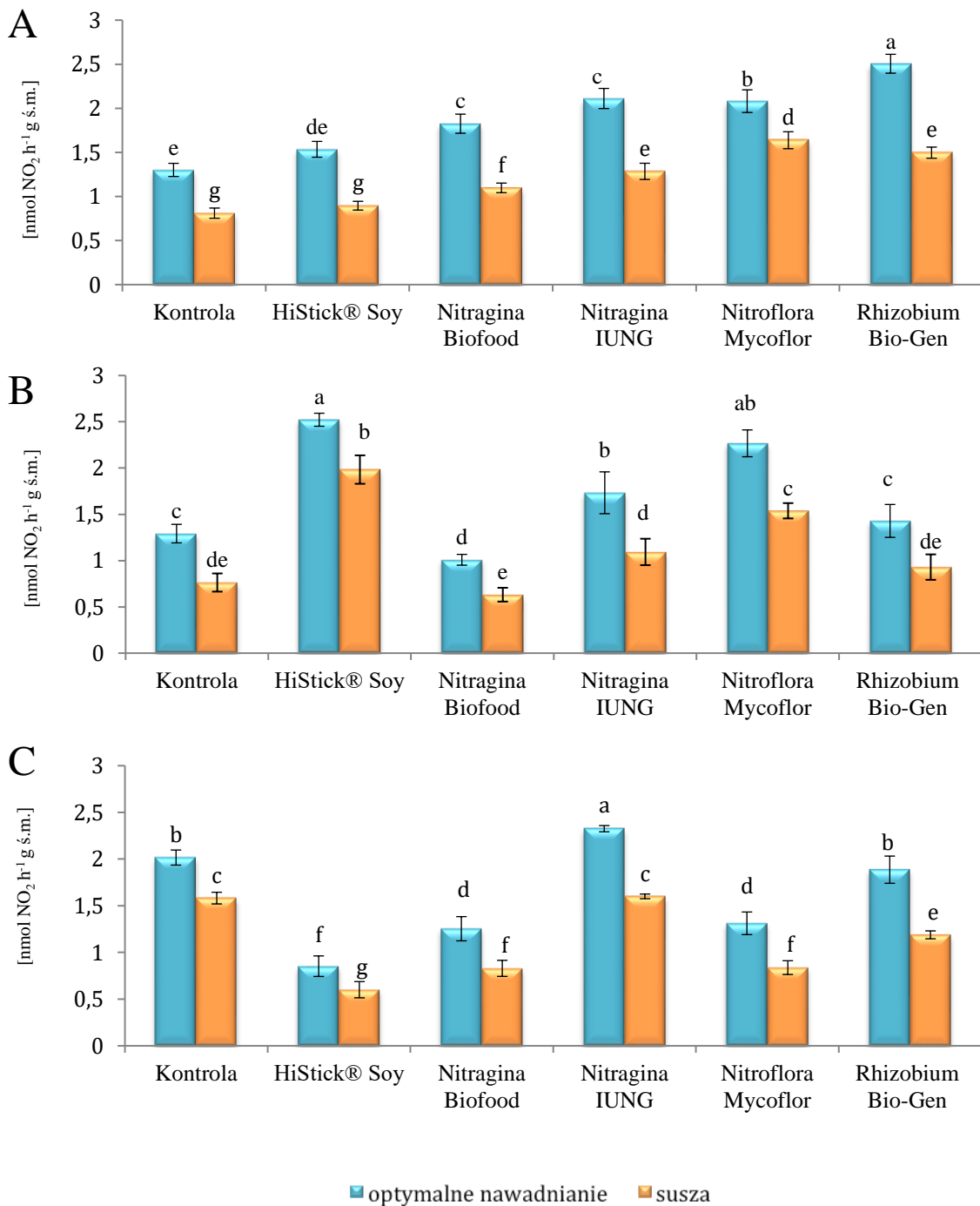
Pod wpływem suszy u wszystkich odmian aktywność reduktazy azotanowej w liściach była istotnie mniejsza w porównaniu do aktywności w roślinach optymalnie nawadnianych (kontroli) (Wykres 5). Rośliny odmiany „Merlin” rosnące w optymalnych warunkach wodnych wykazywały wyższą aktywność tego enzymu pod wpływem Nitraginy IUNG, Nitroflory Mycoflor i HiStick® Soy, natomiast rośliny inokulowane Nitraginą Biofood wykazywały niższą aktywność tego enzymu, a pod wpływem *Rhizobium* Bio-Gen taką samą aktywność, jak w roślinach kontrolnych - nieinokulowanych. Szczepionki Nitragina IUNG, Nitroflora Mycoflor i HiStick® Soy zwiększyły aktywność reduktazy azotanowej w roślinach poddanych stresowi suszy, natomiast pod wpływem Nitraginy Biofood aktywność ta była niższa. Pod wpływem *Rhizobium* Bio-Gen aktywność tego enzymu była wyższa w porównaniu do aktywności odnotowanej w roślinach nieinokulowanych i poddanych suszy.

W przypadku odmiany „Malaga” inokulacja wszystkimi szczepionkami z wyjątkiem HiStick® Soy zwiększyła aktywność reduktazy azotanowej w roślinach optymalnie podlewanych. Podobnie, w warunkach suszy zastosowane szczepionki z wyjątkiem HiStick® Soy także zwiększyły aktywność tego enzymu.

Odmienne od pozostałych odmian, w liściach odmiany „Petrina” w warunkach optymalnego nawadniania, niższą aktywność reduktazy azotanowej odnotowano pod wpływem szczepionki Nitragina Biofood, Nitroflora Mycoflor i HiStick® Soy, natomiast

zwiększoną aktywność reduktazy zarejestrowano w liściach roślin inokulowanych Nitraginą IUNG. W suszy niższą aktywność tego enzymu niż w roślinach kontrolnych oznaczono w liściach roślin inokulowanych Nitraginą Biofood, Nitroflorą Mycoflor, *Rhizobium* Bio-Gen i HiStick® Soy.

Wykres 5. Wpływ szczepionek bakteryjnych oraz suszy na aktywność reduktazy azotanowej w liściach soi uprawnej odmiany „Malaga” (A), „Merlin” (B) i „Petrina” (C). Średnie ($n = 5$) \pm BS zaznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).



Poziom nadtlenu wodoru i aktywność enzymów antyoksydacyjnych

Susza miała istotny wpływ na poziom nadtlenu wodoru w roślinach odmiany „Merlin” i „Petrina” natomiast rodzaj szczepionki miał wpływ tylko w roślinach odmiany „Malaga” (Tabela 33). Oba te czynniki wpływały na aktywność katalazy w roślinach odmiany „Petrina” i „Merlin”, natomiast w roślinach odmiany „Malaga” stwierdzono istotny wpływ suszy na aktywność tego enzymu. Najbardziej wrażliwymi enzymami na działanie obu badanych czynników była POX i SOD.

Tabela 33. Analiza wariancji (ANOVA dwuczynnikowa) wpływu szczepionek (SZ) i stresu suszy (T) na poziom nadtlenu wodoru i aktywność enzymów antyoksydacyjnych odmiany „Malaga”, „Merlin” i „Petrina”. Gwiazdkami zaznaczono istotność wpływu danego czynnika: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; ns – nieistotny.

Odmiana	Czynniki	H ₂ O ₂	KAT	POX	SOD
Malaga	SZ	***	ns	***	***
	T	ns	***	***	***
	SZ + T	***	ns	***	***
Merlin	SZ	ns	*	***	***
	T	***	***	***	***
	SZ + T	ns	ns	***	***
Petrina	SZ	ns	**	***	***
	T	***	***	***	***
	SZ + T	ns	**	***	***

KAT – katalaza; POX – peroksydaza niespecyficzna; SOD – dysmutaza anionorodnika ponadtlenkowego; H₂O₂ – nadtlenek wodoru

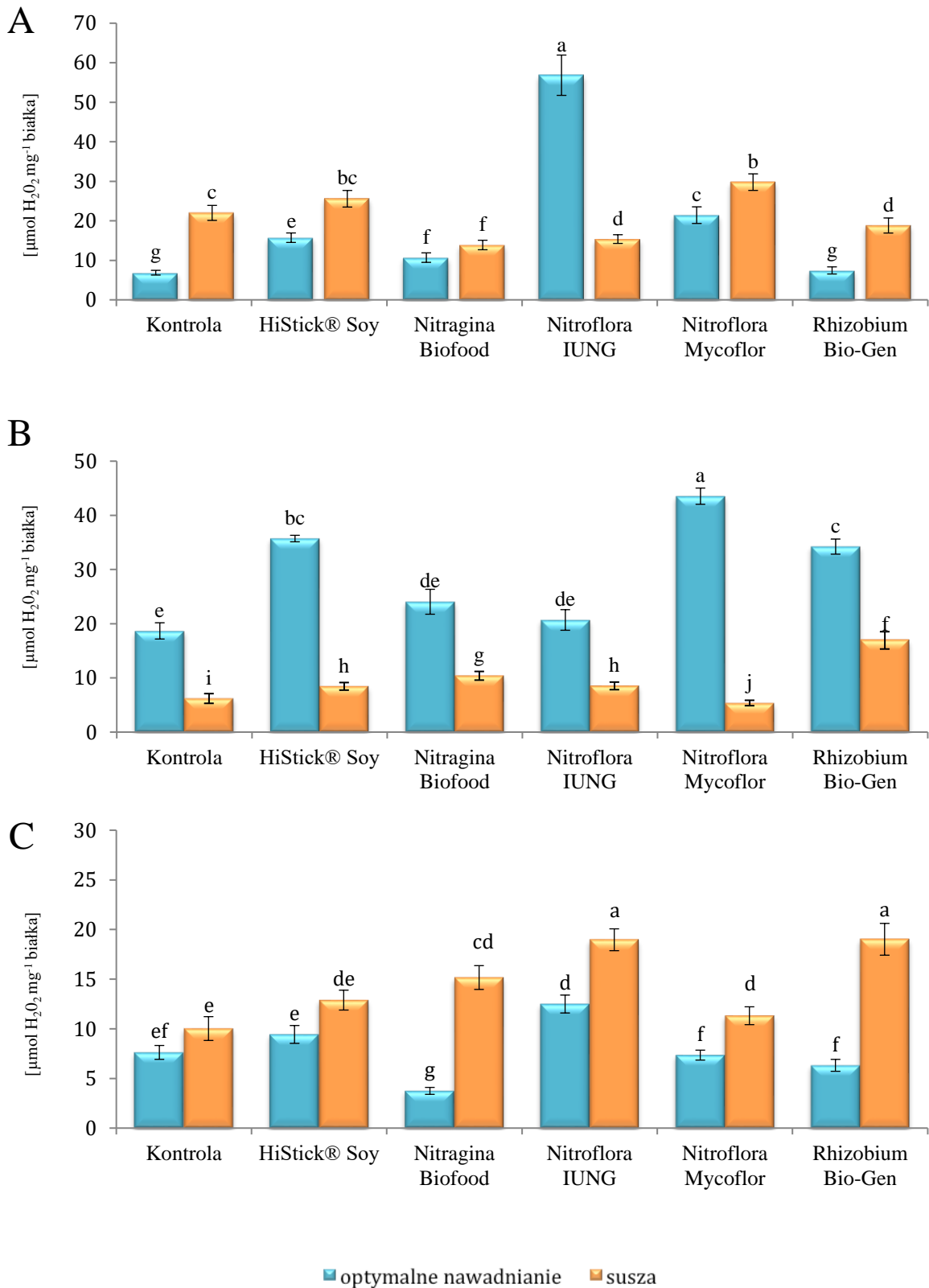
U odmiany „Malaga” szczepionki różnicowały poziom nadtlenu wodoru zarówno w roślinach optymalnie podlewanych, jak i w suszy (Wykres 6A). Nitragina IUNG zwiększyła radykalnie poziom H₂O₂ w roślinach optymalnie nawadnianych w stosunku do wszystkich pozostałych roślin. Dodanie szczepionki Nitragina Biofood, Nitroflora, HiStick® Soy do roślin optymalnie nawadnianych także zwiększyło poziom H₂O₂ w stosunku do roślin nieinokulowanych. W przypadku tej grupy roślin susza spowodowała wzrost poziomu nadtlenu wodoru. Podobny efekt obserwowano w przypadku roślin inokulowanych wszystkimi szczepionkami z wyjątkiem Nitraginy IUNG.

W liściach wszystkich roślin odmiany „Merlin” poddanych suszy poziom H₂O₂ był istotnie niższy niż w roślinach optymalnie nawadnianych (Wykres 6B). Rośliny dobrze

nawadnianie inokulowane szczepionkami z wyjątkiem Nitraginy IUNG wykazywały wyższy poziom nadtlenu wodoru w stosunku do roślin nieinokulowanych. U tej odmiany inokulacja szczepionkami nie wyrównała poziomu tego związku do poziomu obserwowanego w roślinach optymalnie nawadnianych.

Zawartość nadtlenu wodoru w liściach odmiany „Petrina”, niezależnie od traktowania, była mniejsza niż u odmiany „Merlin” i „Malaga”. Również u tej odmiany Nitragina IUNG zwiększyła istotnie poziom H_2O_2 w roślinach optymalnie nawadnianych w stosunku do wszystkich pozostałych roślin. Traktowanie suszą istotnie zwiększyło zawartość nadtlenu wodoru, zarówno w roślinach nieinokulowanych, jak i w roślinach inokulowanych różnymi szczepionkami. Ta reakcja była odmienna od zmian w poziomie H_2O_2 oznaczonych u odmiany „Merlin”.

Wykres 6. Wpływ szczepionek bakteryjnych oraz stresu suszy na poziom nadtlenku wodoru w liściach soi uprawnej odmiany „Malaga” (A), „Merlin” (B) i „Petrina” (C). Średnie ($n = 3$) \pm BS zaznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).



Katalaza

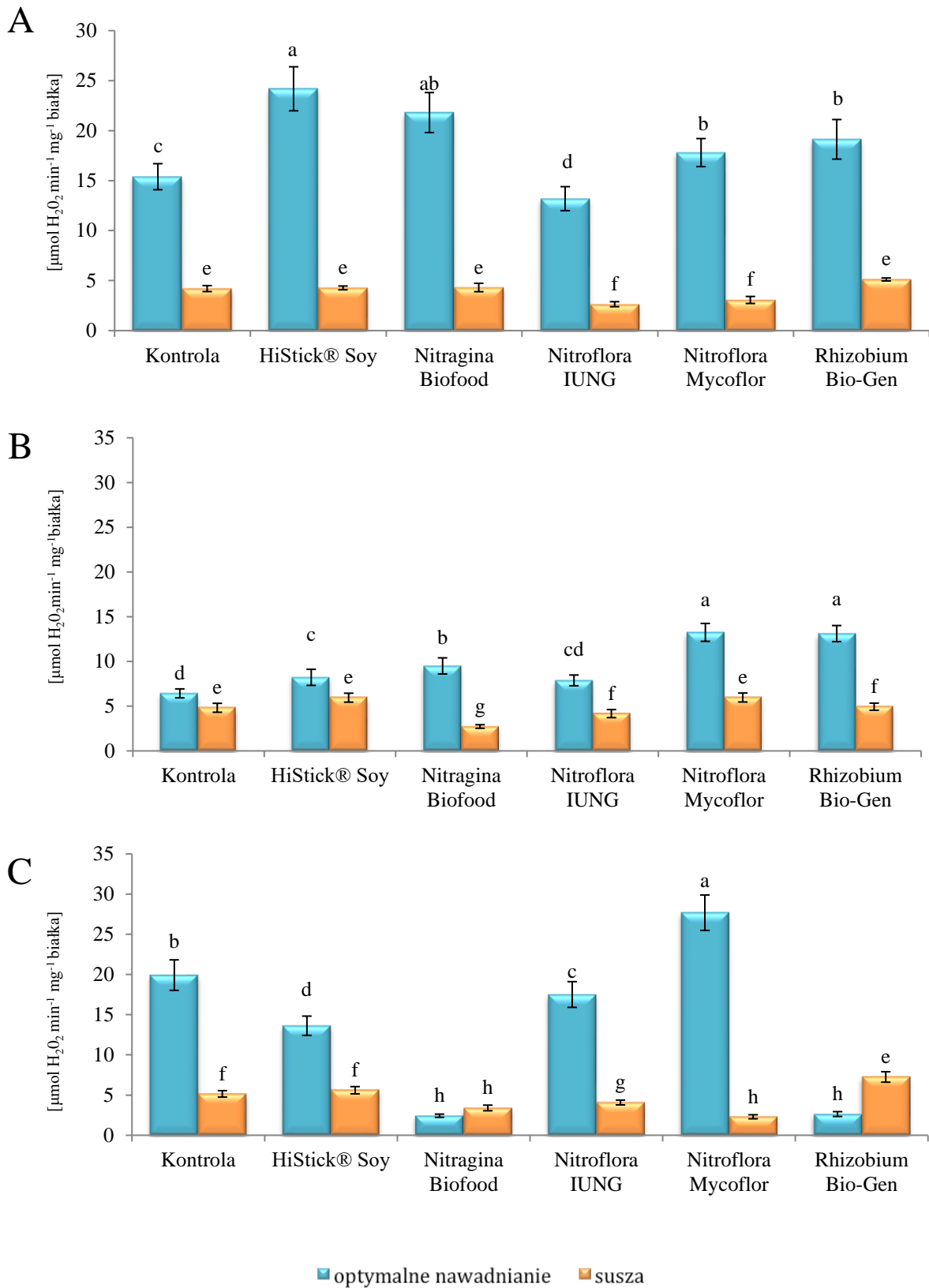
Aktywność katalazy w liściach wszystkich trzech odmian była zdecydowanie niższa w roślinach poddanych suszy, zarówno w roślinach nieinokulowanych, jak i inokulowanych wszystkimi zastosowanymi szczepionkami w porównaniu do roślin optymalnie nawadnianych (Wykres 7A, B, C). Najniższą aktywność katalazy pod wpływem suszy zanotowano w przypadku odmiany „Malaga” i „Petrina”. Inokulacja szczepionkami wywoływała specyficzną reakcję u każdej z odmian.

W roślinach odmiany „Malaga” optymalnie nawadnianych najwyższą aktywność katalazy obserwowano pod wpływem Nitraginy Biofood i HiStick® Soy. W roślinach poddanych stresowi suszy najniższą aktywność katalazy obserwowano u roślin inokulowanych Nitraginą IUNG i Nitroflorą Mycoflor.

W roślinach odmiany „Merlin” (Wykres 7B) optymalnie nawadnianych, najwyższą aktywność katalazy obserwowano pod wpływem Nitroflory Mycoflor i *Rhizobium* Bio-Gen. Najniższą aktywność KAT zanotowano w roślinach nieinokulowanych, zaś najniższą aktywność tego enzymu w roślinach poddanych suszy zanotowano pod wpływem Nitraginy Biofood.

W roślinach odmiany „Petrina” optymalnie nawadnianych najwyższą aktywność KAT zanotowano u roślin inokulowanych Nitroflorą Mycoflor, a najniższą aktywność tego enzymu w roślinach inokulowanych Nitraginą Biofood i *Rhizobium* Bio-Gen (Wykres 7C). W przypadku roślin poddanych stresowi suszy, najniższą aktywność katalazy obserwowano pod wpływem Nitroflory Mycoflor.

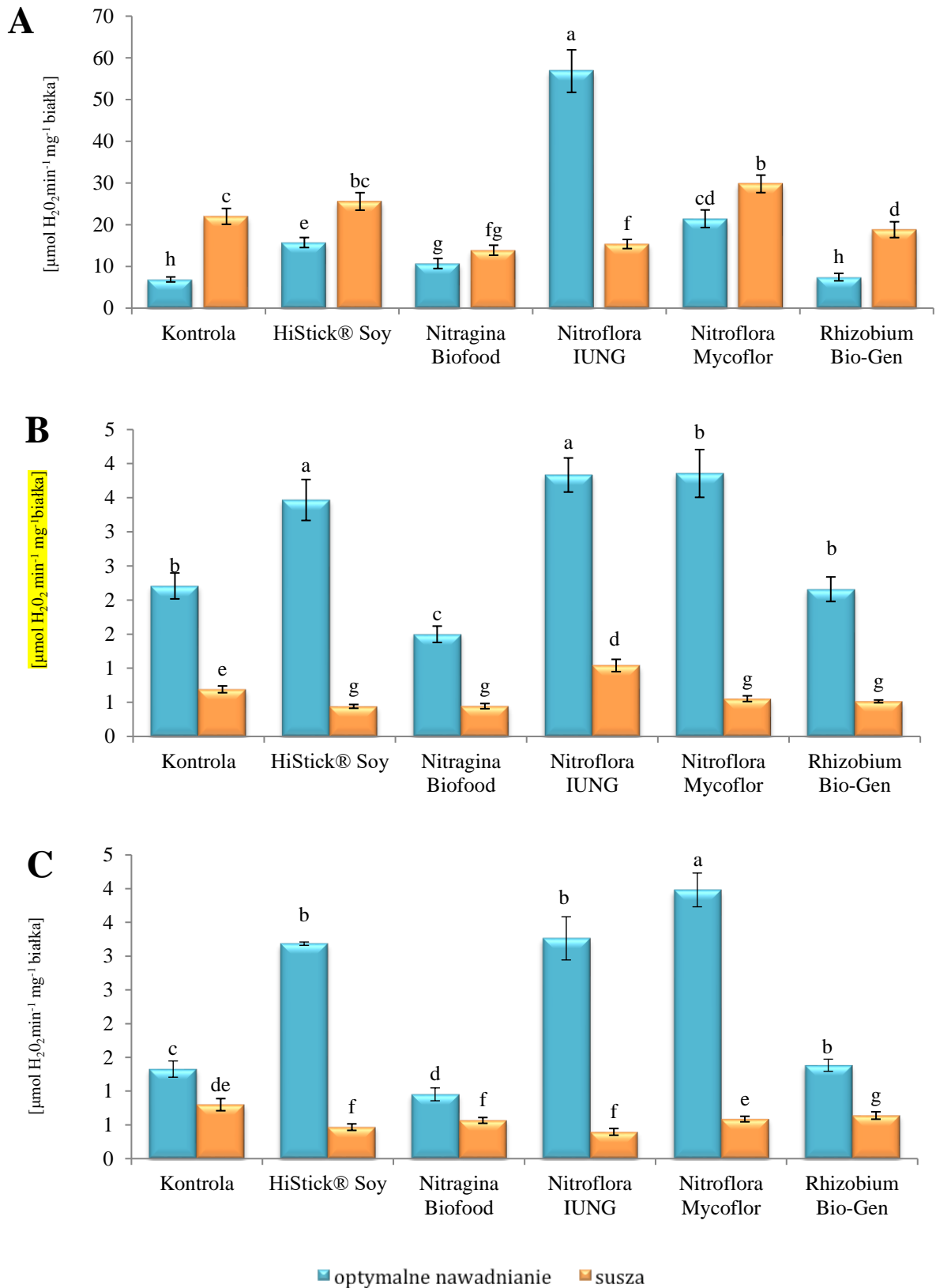
Wykres 7. Wpływ szczepionek bakteryjnych oraz stresu suszy na aktywność katalazy w liściach soi uprawnej odmiany „Malaga” (A), „Merlin” (B) i „Petrina” (C). Średnie ($n = 3$) \pm BS zaznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).



Peroksydaza niespecyficzna

Podobnie jak w przypadku poprzednich enzymów antyoksydacyjnych, susza istotnie obniżyła aktywność POX u wszystkich badanych odmian, niezależnie od zastosowanej szczepionki (Wykres 8A, B, C). Aktywność POX w roślinach odmiany „Malaga” optymalnie nawadnianych była niższa niż w suszy zarówno w roślinach nieinokulowanych, jak i inokulowanych, z wyjątkiem roślin z Nitraginą IUNG, która zwiększyła aktywność POX w roślinach optymalnie nawadnianych prawie czterokrotnie, porównując do aktywności w roślinach w suszy (Wykres 8A). Aktywność POX w roślinach odmiany „Marlin” i „Petrina” kształtowała się podobnie w optymalnych warunkach nawadniania, jak i w suszy (Wykres 8B i C). Rośliny obu odmian optymalnie nawadniane wykazywały istotnie większą aktywność POX w porównaniu do aktywności tego enzymu w roślinach rosnących w deficycie wody. Rośliny tych odmian w optymalnych warunkach nawodnienia wykazywały najwyższą aktywność peroksydazy pod wpływem Nitraginy IUNG, Nitroflory Mycoflor i HiStick® Soy. W suszy aktywność POX kształtowała się podobnie w roślinach inokulowanych wszystkimi szczepionkami i była ona niższa niż w roślinach nieinokulowanych.

Wykres 8. Wpływ szczepionek bakteryjnych oraz stresu suszy na aktywność peroksydazy niespecyficznej w liściach soi uprawnej odmiany „Malaga” (A), „Merlin” (B) i „Petrina” (C). Średnie ($n = 3$) \pm BS zaznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).



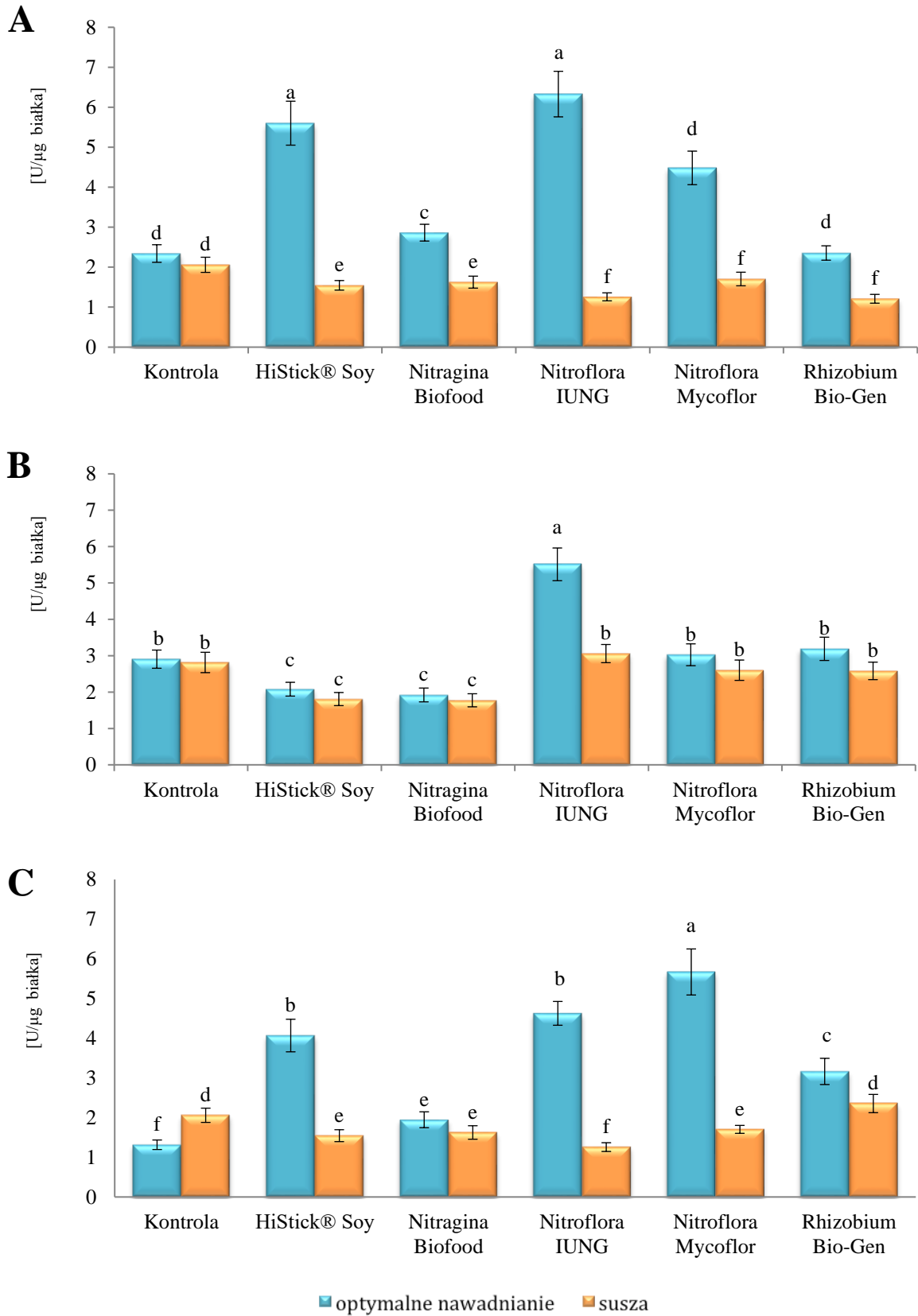
Dysmutaza anionorodnika ponadtlenkowego

W nieinokulowanych roślinach odmiany „Malaga” aktywność SOD była taka sama niezależnie od stopnia uwodnienia gleby (Wykres 9A). W roślinach optymalnie nawadnianych najwyższą aktywność SOD zanotowano pod wpływem Nitraginy IUNG, a następnie Nitroflory Mycoflor i HiStick® Soy. Susza najsilniej obniżyła aktywność SOD w roślinach inokulowanych Nitraginą IUNG (ponad pięciokrotnie). W przypadku roślin inokulowanych szczepionką HiStick® Soy aktywność SOD w suszy była 3,6 razy mniejsza.

W liściach roślin odmiany „Merlin” susza zmniejszyła aktywność SOD tylko w roślinach inokulowanych Nitraginą IUNG (Wykres 9B). Pod wpływem suszy w roślinach nieinokulowanych i inokulowanych pozostałymi szczepionkami nie odnotowano istotnych różnic w aktywności tego enzymu, porównując do roślin optymalnie nawadnianych.

Aktywność SOD w roślinach odmiany „Petrina” optymalnie nawadnianych kształtowała się podobnie, jak w przypadku odmiany „Malaga” (Wykres 9C). Najwyższą aktywność tego enzymu w tej grupie roślin stwierdzono pod wpływem Nitraginy IUNG, Nitroflory i HiStick® Soy. Również w przypadku tych szczepionek istotnie zmniejszyła się aktywność SOD pod wpływem suszy. W roślinach inokulowanych Nitraginą Biofood i *Rhizobium* Bio-Gen różnice w aktywności SOD u roślin nawadnianych i poddanych suszy były niewielkie. W roślinach nieinokulowanych, w suszy zanotowano wyższy poziom aktywności tego enzymu niż w roślinach dobrze nawadnianych.

Wykres 9. Wpływ szczepionek bakteryjnych oraz stresu suszy na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w liściach soi uprawnej odmiany „Malaga” (A), „Merlin” (B) i „Petrina” (C). Średnie ($n = 3$) \pm BS zaznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).



Wysokość roślin, świeża i sucha masa oraz relatywna zawartość wody w roślinach (RWC)

Zarówno rodzaj szczepionki, jak i susza miały istotny wpływ na wysokość roślin, świeżą masę części nadziemnej i relatywną zawartość wody u wszystkich badanych odmian (Tabela 34). Na suchą masę części nadziemnej miała wpływ tylko susza.

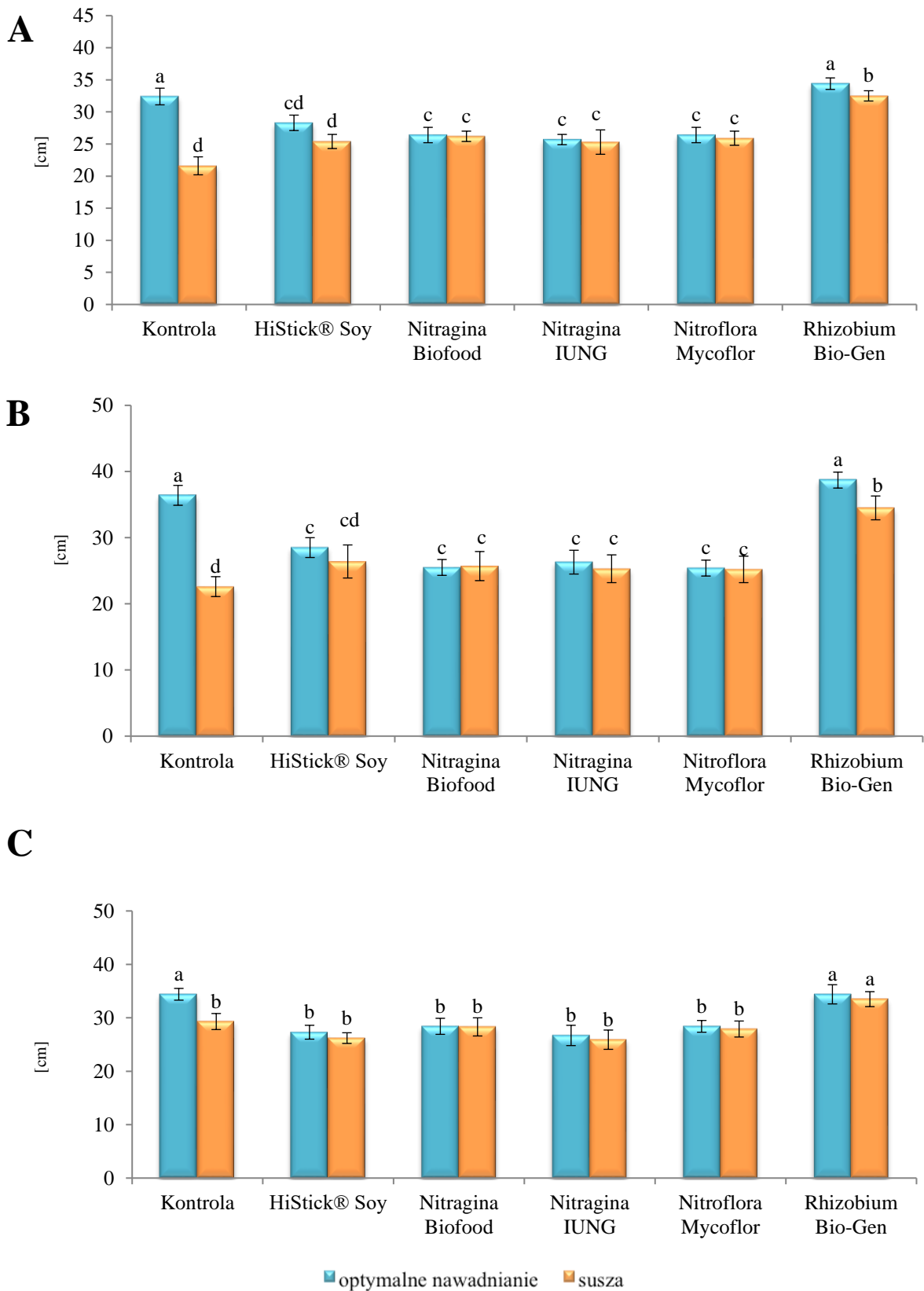
Tabela 34. Analiza wariancji (ANOVA dwuczynnikowa) wpływu szczepionek (SZ) i traktowania tj. optymalnego nawadniania i suszy (T) na wysokość roślin, świeżą (ś.m.) i suchą masę (s.m.) oraz relatywną zawartość wody (RWC) w częściach nadziemnych roślin odmian „Malaga”, „Merlin” i „Petrina”. Gwiazdkami zaznaczono istotność wpływu danego czynnika: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; ns – nieistotny.

Odmiana	Czynnik	Wysokość roślin [cm]	ś. m. [g]	s. m. [g]	RWC [%]
Malaga	SZ	***	***	ns	***
	T	***	***	***	***
	SZ × T	***	***	ns	***
Merlin	SZ	***	***	ns	***
	T	***	***	***	***
	SZ × T	***	**	ns	**
Petrina	SZ	***	***	ns	***
	T	***	***	***	***
	SZ × T	***	***	ns	***

Wysokość roślin

Susza zmniejszyła istotnie wysokość roślin nieinokulowanych wszystkich badanych odmian (Wykres 10 A, B, C). Rośliny inokulowane wszystkimi szczepionkami w warunkach suszy były tak samo wysokie, jak rośliny dobrze nawadnianie, co świadczy o łagodzącym wpływie szczepionek na efekt suszy. Jedynie u odmiany „Merlin” szczepionka *Rhizobium* Bio-Gen nie wykazała tego efektu (Wykres 10 B).

Wykres 10. Wpływ szczepionek bakteryjnych oraz stresu suszy na wysokość roślin soi uprawnej odmiany „Malaga” (A), „Merlin” (B) i „Petrina” (C). Średnie ($n = 20$) \pm BS zaznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncan; $p < 0,05$).



Świeża i sucha masa roślin

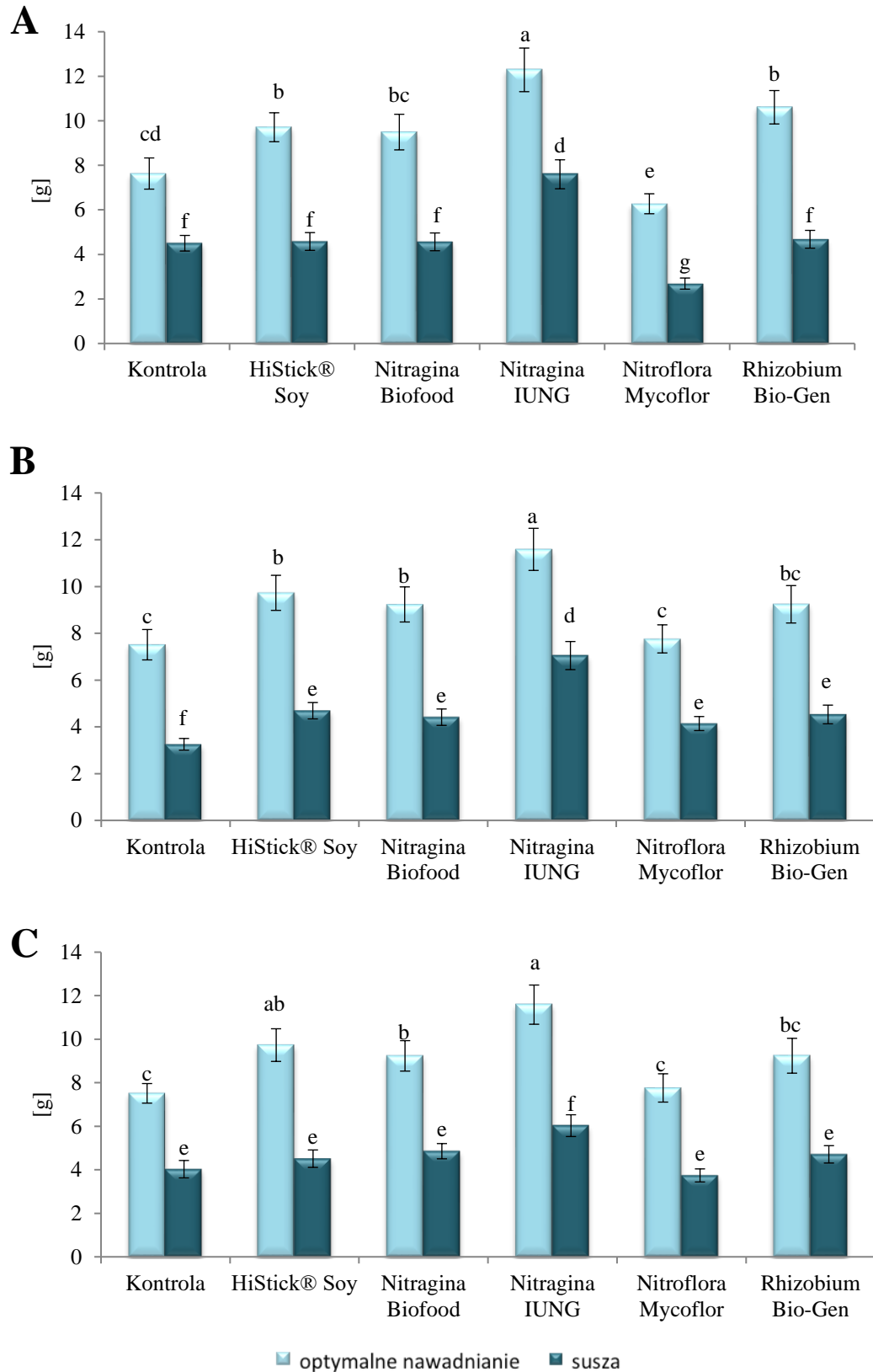
Do analizy świeżej i suchej masy pobierano całe rośliny (wraz ze strąkami) bez korzeni. W warunkach optymalnego nawadniania zastosowanie Nitraginy IUNG zwiększyło świeżą masę roślin wszystkich odmian w porównaniu do roślin nieinokulowanych (Wykres 11A, B, C). W przypadku odmiany „Malaga”, w warunkach optymalnego nawadniania najmniej świeżej masy zebrano z roślin inokulowanych Nitraginą Mycoflor. Również z roślin inokulowanych tą szczepionką po zakończeniu suszy zebrano najmniej suchej masy (Wykres 11A). Z kolei susza spowodowała najmniejsze straty w suchej masie w roślinach inokulowanych Nitraginą IUNG.

Świeża masa roślin odmiany „Merlin”, w warunkach optymalnego nawodnienia inokulowanych wszystkimi szczepionkami z wyjątkiem Nitroflory Mycoflor była większa od masy zebranej z roślin nieinokulowanych (Wykres 11B). W suszy świeża masa roślin traktowanych wszystkimi szczepionkami była większa od roślin kontrolnych, a najmniejsze straty odnotowano w przypadku roślin inokulowanych Nitraginą IUNG. Podobne wyniki uzyskano dla odmiany „Petrina” (Wykres 11 C).

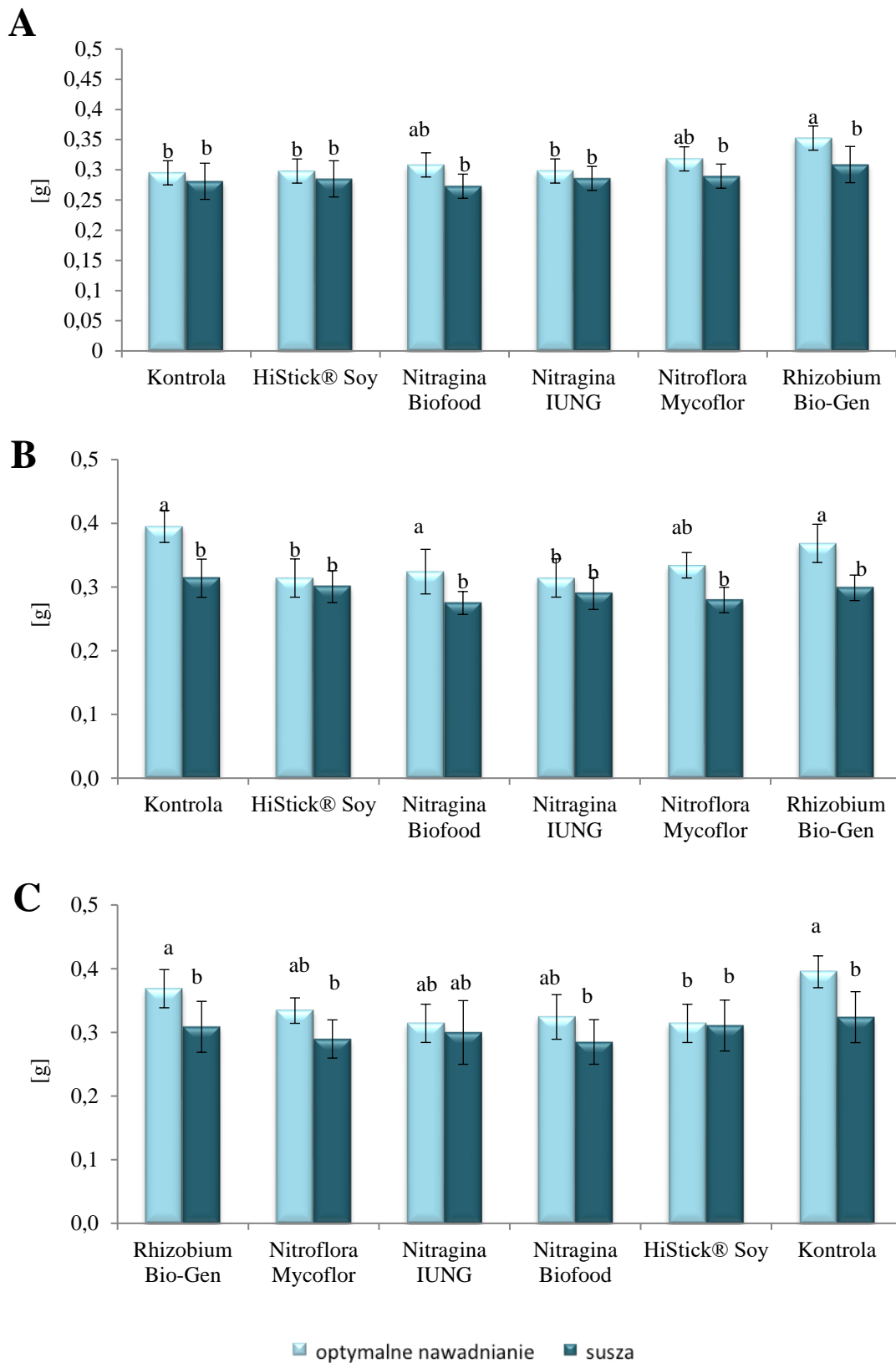
W przypadku odmiany „Malaga”, w optymalnych warunkach nawodnienia najwięcej suchej masy uzyskano z roślin inokulowanych szczepionką *Rhizobium* Bio-Gen (Wykres 12 A). Susza nie zmniejszyła suchej masy ani roślin kontrolnych, ani inokulowanych. W warunkach optymalnego nawodnienia, z odmiany „Merlin” najwięcej suchej masy zebrano z roślin kontrolnych tj. nieinokulowanych i po zastosowaniu szczepionki *Rhizobium* Bio-Gen (Wykres 12 B). Susza obniżyła suchą masę wszystkich roślin z wyjątkiem inokulowanych Nitraginą IUNG i HiStick® Soy.

U odmiany „Petrina” w przypadku roślin optymalnie podlewanych, wpływ szczepionek na zbiór suchej masy był podobny, jak u odmiany „Merlin”, jednakże susza obniżyła jej zawartość tylko w roślinach kontrolnych (Wykres 12 C).

Wykres 11. Wpływ szczepionek bakteryjnych w optymalnych warunkach nawadniania oraz warunkach suszy na zawartość świeżej masy w roślinach soi uprawnej odmiany „Malaga” (A), „Merlin” (B) i „Petrina” (C). Średnie ($n = 20$) \pm BS zaznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).



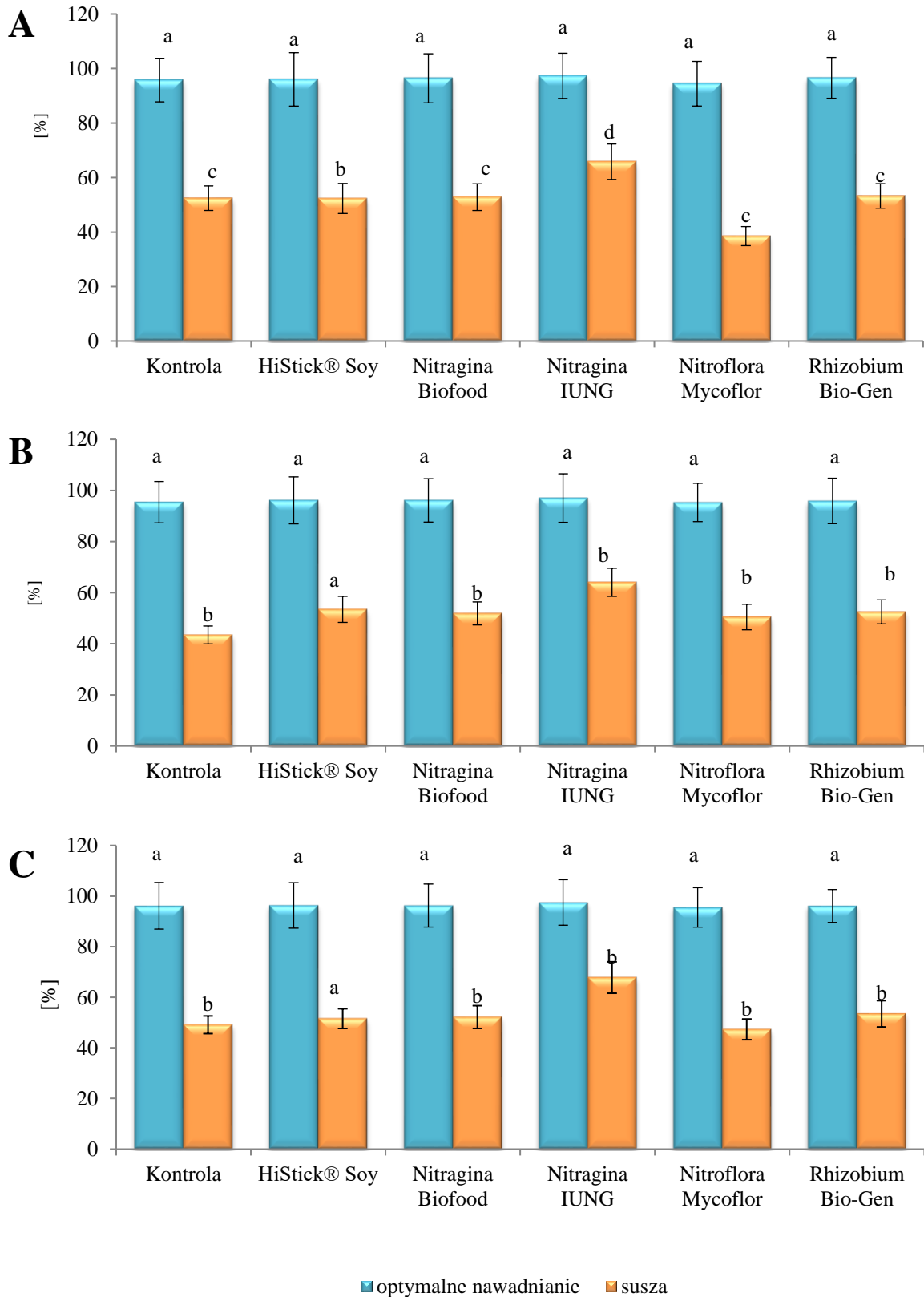
Wykres 12. Wpływ szczepionek bakteryjnych w optymalnych warunkach nawadniania oraz w warunkach suszy na zawartość suchej masy w roślinach soi uprawnej odmiany „Malaga” (A), „Merlin” (B) i „Petrina” (C). Średnie ($n = 20$) \pm BS zaznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).



Relatywna zawartość wody w roślinach (RWC)

Wartość współczynnika RWC dla wszystkich badanych w tym doświadczeniu odmian soi, w warunkach optymalnego nawodnienia była podobna w liściach roślinach traktowanych różnymi szczepionkami i w roślinach nieinokulowanych tj. kontrolnych (Wykres 13 A,B,C). U wszystkich odmian niezależnie od zastosowanej szczepionki, wartość RWC zmniejszyła się istotnie pod wpływem suszy. W przypadku odmiany „Malaga” i „Petrina” (Wykres 13A, C) wartość RWC w warunkach suszy była taka sama dla wszystkich roślin, z wyjątkiem roślin inokulowanych Nitraginą IUNG, dla których RWC było najwyższe. W roślinach odmiany „Merlin” w suszy największa względna zawartość wody była notowana w roślinach nieinokulowanych i inokulowanych Nitraginą IUNG (Wykres 13 B). Najmniejszą wartość RWC w tych warunkach zanotowano w roślinach inokulowanych Nitroflorą Mycoflor. W przypadku roślin inokulowanymi pozostałymi szczepionek wartość RWC była taka sama.

Wykres 13. Wpływ szczepionek bakteryjnych oraz stresu suszy na wskaźnik RWC (relatywna zawartość wody) w roślinach soi uprawnej odmiany „Malaga” (A), „Merlin” (B) i „Petrina” (C). Średnie ($n = 20$) \pm BS zaznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).



Liczba brodawek korzeniowych oraz parametry plonu

Rodzaj szczepionki miał wpływ u wszystkich odmian na liczbę brodawek, natomiast susza nie miała wpływu na ten parametr tylko u odmiany „Petrina” (Tabela 42). W przypadku odmiany „Malaga”, szczepionki wpływały na liczbę strąków, nasion i ich masę, natomiast nie na MTN (Tabela 42). Susza różnicowała liczbę nasion i ich masę. U odmiany „Merlin” szczepionki decydowały o liczbie strąków, liczbie nasion i ich masie, a nie o MTN. Susza nie miała istotnego wpływu na badane parametry plonu tej odmiany. W roślinach odmiany „Petrina”, wszystkie badane parametry plonowania zależały od zastosowanej szczepionki, natomiast susza wpływała tylko na liczbę nasion i MTN.

Tabela 35. Analiza wariancji (ANOVA dwuczynnikowa) wpływu szczepionek (SZ) i stresu suszy (S) na liczbę brodawek i parametry plonu roślin soi odmiany „Malaga”, „Merlin” i „Petrina”. Gwiazdkami zaznaczono istotność wpływu danego czynnika: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; ns – nieistotny.

Odmiana	Czynniki	Liczba brodawek	Średnia liczba strąków /roślinę	Średnia liczba nasion/ roślinę	Średnia masa nasion [g]	Masa tysiąca nasion [g]
Malaga	SZ	***	***	***	***	ns
	T	***	ns	***	**	ns
	SZ × T	***	ns	***	ns	ns
Merlin	SZ	***	***	***	***	ns
	T	**	ns	ns	ns	ns
	SZ × T	**	*	ns	ns	ns
Petrina	SZ	***	***	***	***	***
	T	ns	ns	***	ns	***
	SZ × T	***	***	***	**	***

W roślinach odmiany „Malaga”, optymalnie nawadnianych, inokulacja Nitraginą IUNG i Nitraginą Biofood zwiększyła liczbę brodawek, natomiast *Rhizobium* Bio-Gen i HiStick® Soy zmniejszyły ich liczbę (Tabela 36). W suszy wszystkie zastosowane szczepionki z wyjątkiem *Rhizobium* Bio-Gen zwiększyły liczbę brodawek korzeniowych.

W warunkach optymalnego nawodnienia, liczba brodawek na korzeniach roślin odmiany „Merlin” była istotnie większa pod wpływem szczepionek Nitragina IUNG, Nitragina Biofood, *Rhizobium* Bio-Gen i HiStick® Soy w porównaniu do roślin nieinokulowanych. W suszy, inokulacja wszystkimi szczepionkami zwiększyła liczbę brodawek, a największą ich liczbę zanotowano pod wpływem Nitraginy Biofood.

U odmiany „Petrina” w roślinach optymalnie nawadnianych, liczba brodawek zwiększyła się jedynie pod wpływem inokulacji szczepionką HiStick® Soy, a zmniejszyła się po inokulacji Nitroflorą Mycoflor, Nitraginą Biofood i *Rhizobium* Bio-Gen. W suszy liczba brodawek była większa niż w roślinach optymalnie nawadnianych po zastosowaniu Nitraginy IUNG, Nitroflory Mycoflor, HiStick® Soy i *Rhizobium* Bio-Gen.

W roślinach nieinokulowanych, susza istotnie zmniejszyła liczbę brodawek korzeniowych wszystkich badanych odmian. W suszy zastosowane szczepionki zwiększyły tę liczbę w porównaniu do roślin nieinokulowanych oraz wyrównały ją do liczby brodawek na korzeniach roślin optymalnie nawadnianych. Szczepionki zdecydowanie łagodziły efekt suszy pod kątem procesu nodulacji. Najwięcej brodawek, zarówno w warunkach optymalnego nawadniania, jak i w suszy, powstawało pod wpływem Nitraginy IUNG, głównie u odmian „Malaga” i „Merlin”. Drugą szczepionką, istotnie wpływającą na nodulację, była Nitragina Biofood, również u tych dwóch odmian. Odmiana „Petrina” wytrwarzała najmniejszą liczbę brodawek, niezależnie od zastosowanej szczepionki w porównaniu do pozostałych odmian.

Tabela 36. Wpływ szczepionek bakteryjnych w warunkach suszy na liczbę brodawek korzeniowych soi uprawnej odmiany „Malaga”, „Merlin” i „Petrina”. Średnie ($n = 10$) \pm BS zaznaczone w wierszach tą samą dużą literą, a w kolumnie małą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).

Szczepionka bakteryjna	Malaga		Merlin		Petrina	
	A	B	A	B	A	B
Kontrola	5,3 \pm 1,6 ^{Ccd}	2,8 \pm 0,9 ^{Dd}	5,2 \pm 0,3 ^{Ce}	2,2 \pm 0,1 ^{De}	9,4 \pm 0,6 ^{Ab}	6,2 \pm 0,8 ^{Bb}
Nitragina Biofood	12,1 \pm 1,3 ^{Bb}	14,1 \pm 0,9 ^{Bb}	18,9 \pm 1,0 ^{Ab}	21,4 \pm 2,1 ^{Aa}	6,1 \pm 0,6 ^{Cc}	6,3 \pm 0,7 ^{Cb}
Nitragina IUNG	20,3 \pm 2,2 ^{Aa}	22,7 \pm 1,9 ^{Aa}	22,4 \pm 1,4 ^{Aa}	24,3 \pm 2,5 ^{Aa}	10,7 \pm 0,8 ^{Bab}	11,4 \pm 0,9 ^{Ba}
Nitroflora	6,5 \pm 0,3 ^{BCc}	7,1 \pm 0,8 ^{ABc}	5,9 \pm 0,2 ^{Ce}	7,4 \pm 0,2 ^{ABd}	7,9 \pm 0,3 ^{ABbc}	8,5 \pm 0,3 ^{Ab}
HiStick® Soy	3,9 \pm 0,9 ^{Bd}	5,0 \pm 1,8 ^{Bcd}	9,8 \pm 0,4 ^{Ad}	11,3 \pm 0,9 ^{Ac}	11,2 \pm 0,7 ^{Aa}	11,3 \pm 1,3 ^{Aa}
<i>Rhizobium</i> Bio-Gen	2,8 \pm 0,9 ^{Dd}	3,4 \pm 0,9 ^{Dd}	13,4 \pm 0,4 ^{Bc}	17,3 \pm 1,4 ^{Ab}	7,5 \pm 0,8 ^{Cc}	8,2 \pm 0,9 ^{Cb}

A – optymalne warunki wodne, B – susza, Kontrola – rośliny nieinokulowane szczepionkami

W przypadku odmiany „Malaga”, susza zmniejszyła jedynie liczbę nasion zebranych z roślin kontrolnych – nieinokulowanych w porównaniu do roślin optymalnie podlewanych (Tabela 37). Inokulacja szczepionkami z wyjątkiem Nitroflory Mycoflor zdecydowanie

zwiększyła plonowanie w stosunku do roślin nieinokulowanych w warunkach zarówno dobrego nawadniania, jak i w suszy. Jedyne MTN była taka sama dla wszystkich roślin niezależnie od stosowanej szczepionki.

U odmiany „Merlin” w roślinach nieinokulowanych (kontroli) susza obniżyła wszystkie parametry plonowania w porównaniu do plonu uzyskanego z roślin optymalnie podlewanych (Tabela 38). Podobnie, jak w przypadku odmiany „Malaga”, szczepionki wyrównały plonowanie roślin w suszy do poziomu plonowania roślin optymalnie nawadnianych. Podobne wyniki uzyskano dla odmiany „Petrina” (Tabela 39).

Tabela 37. Wpływ szczepionek bakteryjnych w warunkach suszy na parametry plonu soi uprawnej odmiany „Malaga”. Średnie ($n = 20$) \pm BS zaznaczone w kolumnach taką samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).

Szczepionka		Liczba strąków /roślinę	Liczba nasion /roślinę	Średnia masa nasion[g] / roślinę	Masa tysiąca nasion [g]
Kontrola	A	6,5 \pm 0,9 ^{cd}	19,3 \pm 1,2 ^{cd}	2,85 \pm 0,94 ^d	147,66 \pm 12,31 ^a
	B	4,5 \pm 0,4 ^d	12,3 \pm 0,9 ^e	1,73 \pm 0,22 ^d	140,65 \pm 11,43 ^a
Nitragina Biofood	A	11,0 \pm 0,9 ^b	28,8 \pm 1,8 ^b	4,21 \pm 0,33 ^b	146,18 \pm 12,92 ^a
	B	10,8 \pm 0,9 ^b	27,9 \pm 1,2 ^b	4,13 \pm 0,23 ^b	148,02 \pm 11,21 ^a
Nitragina IUNG	A	14,9 \pm 1,1 ^a	35,3 \pm 2,8 ^a	5,22 \pm 0,30 ^a	147,87 \pm 10,93 ^a
	B	14,3 \pm 1,7 ^a	32,2 \pm 2,3 ^{ab}	4,93 \pm 0,52 ^{ab}	153,10 \pm 12,18 ^a
Nitroflora Mycoflor	A	7,6 \pm 0,6 ^c	22,5 \pm 1,9 ^c	3,29 \pm 0,14 ^c	146,22 \pm 11,42 ^a
	B	7,5 \pm 0,6 ^c	21,3 \pm 1,7 ^c	3,15 \pm 0,21 ^c	147,88 \pm 10,32 ^a
HiStick® Soy	A	9,8 \pm 0,9 ^b	24,8 \pm 1,3 ^c	3,53 \pm 0,14 ^c	142,41 \pm 12,53 ^a
	B	9,4 \pm 0,9 ^b	24,3 \pm 1,5 ^c	3,59 \pm 0,11 ^c	147,77 \pm 11,91 ^a
<i>Rhizobium</i> Bio-Gen	A	10,8 \pm 1,1 ^b	25,9 \pm 1,3 ^{bc}	3,63 \pm 0,23 ^c	140,15 \pm 11,28 ^a
	B	10,4 \pm 1,7 ^b	25,3 \pm 1,4 ^c	3,53 \pm 0,18 ^c	141,89 \pm 11,13 ^a

A – optymalne nawadnianie, B – susza

Tabela 38. Wpływ szczepionek bakteryjnych w warunkach suszy na parametry plonu soi uprawnej odmiany „Merlin”. Średnie (n = 20) ± BS zaznaczone w kolumnach taką samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; p < 0,05).

Szczepionka		Liczba strąków /roślinę	Liczba nasion /roślinę	Średnia masa Nasion[g] /roślinę	Masa tysiąca nasion [g]
Kontrola	A	5,5 ± 0,9 ^e	18,2 ± 0,9 ^f	2,80 ± 0,51 ^d	153,84 ± 7,51 ^a
	B	3,5 ± 0,4 ^f	11,3 ± 0,5 ^g	1,33 ± 0,22 ^e	117,69 ± 8,93 ^d
Nitragina Biofood	A	11,2 ± 0,3 ^b	27,7 ± 0,2 ^{ab}	3,91 ± 0,33 ^c	141,15 ± 7,81 ^{ab}
	B	9,8 ± 0,4 ^c	26,9 ± 0,1 ^{bc}	3,42 ± 0,23 ^c	127,13 ± 8,21 ^c
Nitragina IUNG	A	15,4 ± 1,2 ^a	31,3 ± 2,2 ^a	5,02 ± 0,30 ^a	160,38 ± 6,73 ^a
	B	14,2 ± 0,9 ^a	29,2 ± 0,3 ^a	4,53 ± 0,32 ^{bc}	154,10 ± 8,12 ^a
Nitroflora Mycoflor	A	7,5 ± 0,5 ^d	21,7 ± 0,9 ^e	2,93 ± 0,14 ^d	135,02 ± 8,72 ^b
	B	7,4 ± 0,3 ^d	21,4 ± 0,6 ^e	3,04 ± 0,21 ^{cd}	142,05 ± 7,62 ^{ab}
HiStick® Soy	A	9,5 ± 0,7 ^c	24,4 ± 0,2 ^d	3,13 ± 0,24 ^c	128,27 ± 6,54 ^c
	B	9,6 ± 0,6 ^c	24,2 ± 0,2 ^d	3,02 ± 0,31 ^{cd}	124,79 ± 5,21 ^c
Rhizobium Bio-Gen	A	10,2 ± 0,1 ^{bc}	26,5 ± 0,2 ^c	3,53 ± 0,23 ^c	133,20 ± 9,54 ^b
	B	10,1 ± 0,1 ^{bc}	26,3 ± 0,1 ^c	3,47 ± 0,28 ^c	131,93 ± 8,23 ^b

A – optymalne nawadnianie, B – susza

Tabela 39. Wpływ szczepionek bakteryjnych w warunkach suszy na parametry plonu soi uprawnej odmiany „Petrina”. Średnie (n = 20) ± BS zaznaczone w kolumnach taką samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; p < 0,05).

Szczepionka		Liczba strąków /roślinę	Liczba nasion /roślinę	Średnia masa Nasion[g] /roślinę	Masa tysiąca nasion [g]
Kontrola	A	7,6 ± 0,6 ^c	21,3 ± 1,1 ^c	3,15 ± 0,54 ^b	147,88 ± 11,51 ^a
	B	5,4 ± 0,4 ^d	17,3 ± 0,6 ^d	1,98 ± 0,22 ^c	114,45 ± 10,49 ^a
Nitragina Biofood	A	10,0 ± 0,1 ^b	29,9 ± 0,2 ^b	4,41 ± 0,34 ^{ab}	147,49 ± 10,92 ^a
	B	10,8 ± 0,3 ^b	31,9 ± 0,2 ^b	4,93 ± 0,22 ^b	154,54 ± 14,56 ^a
Nitragina IUNG	A	15,9 ± 1,1 ^a	39,9 ± 1,8 ^a	5,92 ± 0,30 ^a	148,37 ± 12,93 ^a
	B	16,3 ± 0,7 ^a	40,3 ± 2,3 ^a	6,23 ± 0,32 ^a	154,59 ± 13,19 ^a
Nitroflora	A	7,4 ± 0,2 ^c	24,5 ± 0,8 ^b	3,59 ± 0,18 ^b	146,53 ± 13,81 ^a
	B	7,5 ± 0,3 ^c	24,9 ± 0,9 ^b	3,75 ± 0,27 ^b	150,60 ± 14,31 ^a
HiStick® Soy	A	10,8 ± 0,4 ^b	26,8 ± 0,8 ^c	3,96 ± 0,28 ^b	147,76 ± 12,53 ^a
	B	11,2 ± 0,6 ^b	26,9 ± 0,9 ^c	4,02 ± 0,34 ^{ab}	149,94 ± 13,91 ^a
Rhizobium Bio-Gen	A	9,3 ± 0,7 ^b	25,9 ± 0,8 ^b	3,73 ± 0,43 ^b	144,01 ± 12,28 ^a
	B	10,2 ± 0,5 ^b	30,3 ± 0,9 ^b	4,45 ± 0,75 ^a	146,86 ± 11,13 ^a

6.4.2. Doświadczenie 3 C. Analizy izotopowe węgla ^{13}C i azotu ^{15}N w roślinach odmiany „Petrina” w warunkach suszy

Analizę wykonano na roślinach odmiany „Petrina” inokulowanych szczepionką Nitragina Biofood. Kontrolę stanowiły rośliny optymalnie podlewane, suszę wprowadzone poprzez podlewanie roślin do 20% ppw. Wartości K1 i K2 oznaczają kontrolę przed rozpoczęciem suszy i po zakończeniu suszy tylko dla liści. Liście z roślin kontrolnych przed i po zakończeniu suszy wykazywały podobny wskaźnik dyskryminacji izotopu, co oznacza, że w ciągu trzech tygodni trwania suszy wartość tego wskaźnika się nie zmieniła. Większa wartość wskaźnika dyskryminacji określona w liściach po zakończeniu suszy sugeruje przymknięcie aparatów szparkowych i korzystanie z dwutlenku węgla pochodzącego z oddychania.

W przypadku strąków i nasion zastosowano jedną kontrolę tj. materiał pobrano z roślin niepoddanych suszy równoległe do materiału pobranego z roślin podlewanych tylko do 20% ppw (w odróżnieniu od liści, strąków i nasion nie było jeszcze na roślinach przed rozpoczęciem suszy, stąd w ich przypadku nie podano wartości kontroli K1) (Tabela 40). W strąkach i nasionach wartość tego wskaźnika zwiększyła się w większym stopniu niż w przypadku liści, co oznacza, że w strąkach i nasionach większy był udział dwutlenku węgla pochodzącego z recyklingu (fotooddychania/oddychanie).

Tabela 40. Wartości wskaźnika dyskryminacji izotopu ^{13}C w poszczególnych organach roślin soi uprawnej odmiany „Petrina”.

Liście			Strąki		Nasiona	
Kontrola 1	Kontrola 2	Susza	Kontrola	Susza	Kontrola	Susza
-29,126	-29,158	-28,270	-27,969	-26,275	-28,008	-26,293

Błąd standardowy pomiarów izotopów węgla wynosi 0,1% wartości mierzonej.

W liściach badanej odmiany zanotowano różnice w asymilacji wolnego azotu w roślinach kontrolnych przed rozpoczęciem suszy i po zakończeniu suszy. Po trzech tygodniach znacznie zwiększył się udział asymilowanego azotu przez bakterie brodawkowe. W liściach roślin poddanych suszy odnotowano znacznie wyższą aktywność bakterii asymilujących azot w stosunku do roślin kontrolnych (Tabela 41). W strąkach roślin kontrolnych udział azotu pobranego z powietrza był wyższy niż w strąkach roślin poddanych

suszy. W nasionach udział azotu wiązanego przez bakterie w suszy był wyższy niż w nasionach kontrolnych, jednak różnica ta była o wiele mniejsza niż w przypadku liści i strąków. Azotu pochodzącego z biologicznego wiązania przez bakterie w nasionach było istotnie mniej niż w liściach.

Tabela 41. Procentowy udział azotu pochodzącego z biologicznego wiązania w ogólnym pobieraniu azotu przez rośliny soi uprawnej odmiany „Petrina”. Wartości zaznaczone gwiazdką różnią się istotnie od wartości kontrolnych dla każdego organu osobno: * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$ (test Studenta).

Liście			Strąki		Nasiona	
Kontrola 1	Kontrola 2	Susza	Kontrola	Susza	Kontrola	Susza
72,1	83,3	89,9***	94,8	88,7***	55,5	57,8*

Błąd standardowy pomiarów izotopów azotu wynosi 1% wartości mierzonej.

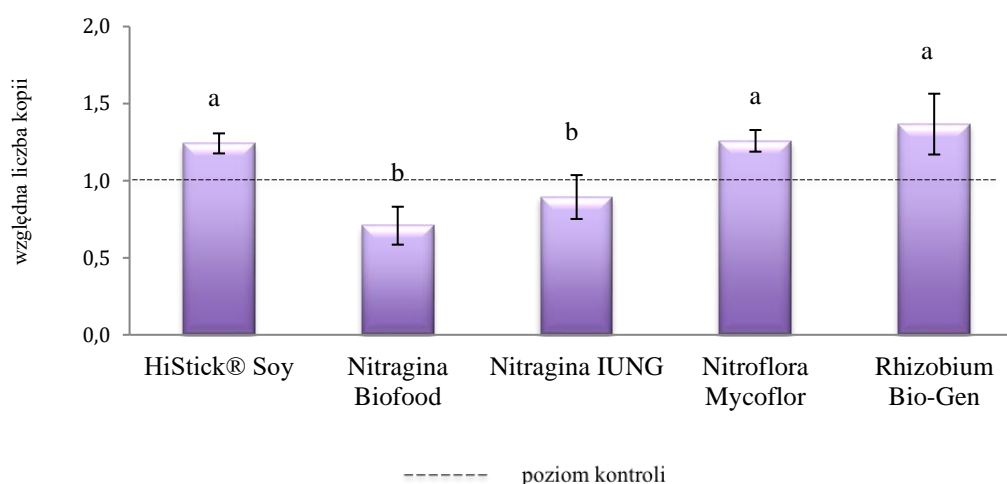
6.4.3. Ekspresja genów *Nod* pod wpływem szczepionek bakteryjnych od różnych producentów

Doświadczenie miało na celu zbadanie wpływu inokulacji nasion soi odmiany „Malaga” szczepionkami od różnych producentów na ekspresję genów *Nod*. Wytypowano kilka genów, które według doniesień literaturowych biorą udział w procesie powstawania brodawek. Wykresy poniżej przedstawiają, jaka była względna liczba kopii każdego z genów po użyciu poszczególnych szczepionek: genu *NOD21* (Wykres 14), genu *NIC1* (Wykres 15), genu *NORKb* (Wykres 16). Kontrolą był materiał roślinny pobrany z korzeni roślin, w których nie zastosowano szczepionek i stanowiła ona punkt odniesienia w obliczaniu względnej liczby kopii danego genu. Na wykresie wartość 1 na osi OY oznacza wartość kontrolną.

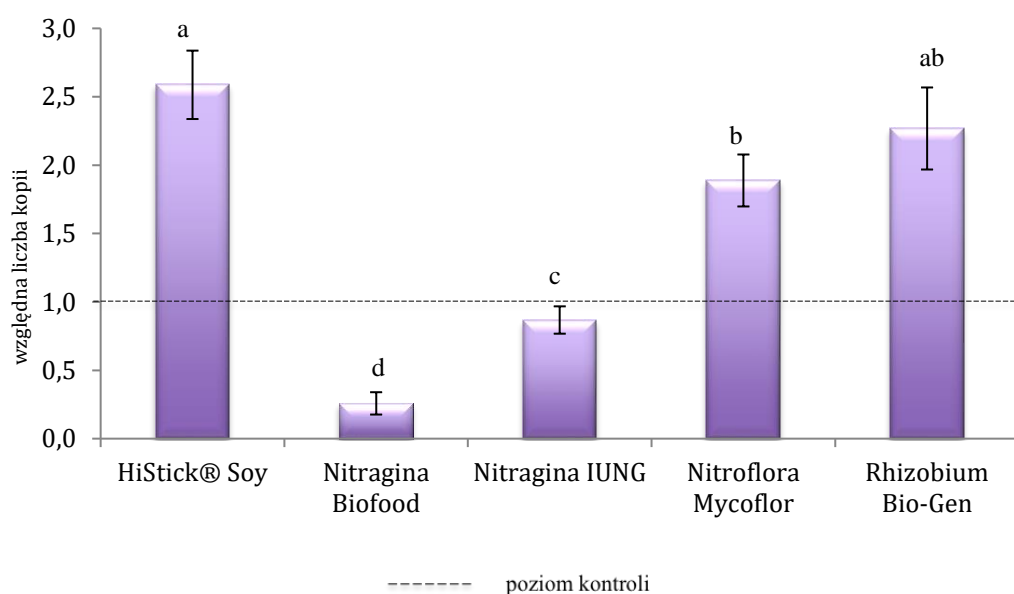
Największe zróżnicowanie ekspresji obserwowano w przypadku genu *NIC1* (Wykres 15). Inokulacja szczepionkami HiStick® Soy i *Rhizobium* Bio-Gen spowodowała największy wzrost ekspresji genu *NIC1* (odpowiednio 2,5-krotnie oraz 2,3-krotnie) w stosunku do kontroli, natomiast szczepionki Nitragina Biofood oraz Nitragina IUNG spowodowały spadek ilości transkryptu tego genu w stosunku do kontroli, przy czym największy spadek spowodowała Nitragina Biofood (odnotowano czterokrotnie mniejszą

ekspresję w porównaniu do kontroli). W przypadku pozostałych genów, poziom ekspresji był dużo mniej zróżnicowany i zbliżony do poziomu wykrytego u kontroli. Warto jednak zauważyć, że inokulacja preparatami Nitragina Biofood oraz Nitragina IUNG powodowała spadek liczby kopii transkryptów wszystkich badanych genów, podczas gdy zastosowanie pozostałych szczepionek skutkowało wzrostem ekspresji.

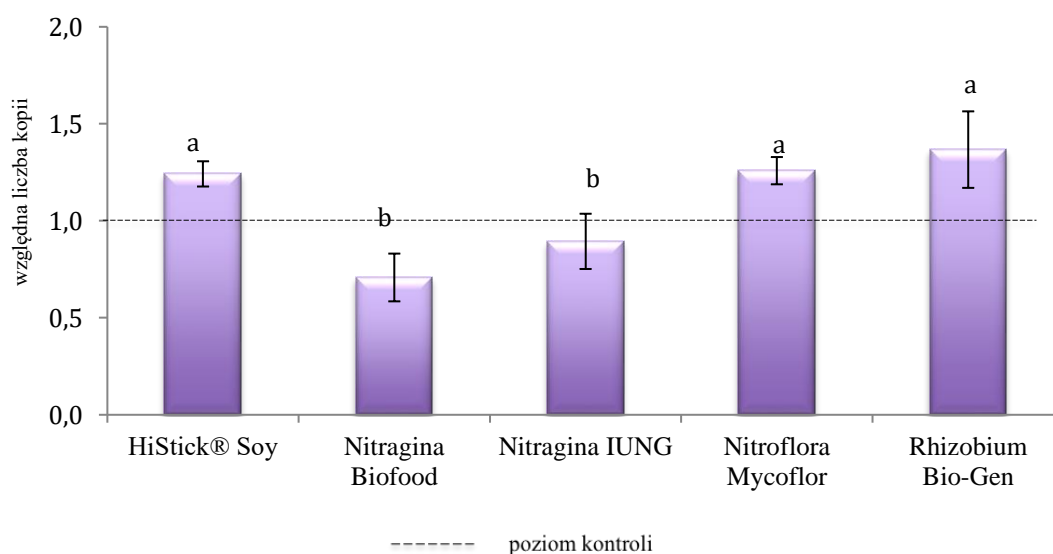
Wykres 14. Liczba kopii mRNA genu *NOD21* jako wielokrotność liczby kopii matrycy w materiale roślinnym pobranym z korzeni soi po zastosowaniu szczepionek bakteryjnych od różnych producentów jako wielokrotność liczby kopii matrycy w materiale roślinnym pobranym z korzeni soi niepoddawanych inokulacji. Średnie ($n = 3$) \pm BS zaznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$)



Wykres 15. Liczba kopii mRNA genu *NICI* jako wielokrotność liczby kopii matrycy w materiale roślinnym pobranym z korzeni soi po zastosowaniu szczepionek bakteryjnych od różnych producentów jako wielokrotność liczby kopii matrycy w materiale roślinnym pobranym z korzeni soi niepoddawanych inokulacji. Średnie ($n = 3$) \pm BS zaznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$)



Wykres 16. Liczba kopii mRNA genu *NORKb* jako wielokrotność liczby kopii matrycy w materiale roślinnym pobranym z korzeni soi po zastosowaniu szczepionek bakteryjnych od różnych producentów jako wielokrotność liczby kopii matrycy w materiale roślinnym pobranym z korzeni soi niepoddawanych inokulacji. Średnie ($n = 3$) \pm BS zaznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$)



7. Dyskusja

Jednym z ważnych gospodarczo i przemysłowo gatunków roślin uprawianych na świecie jest soja zwyczajna. Spowodowane jest to wszechstronnością wykorzystywania nasion tego gatunku w przemyśle paszowym oraz spożywczym [Jarecki i Borecka-Jamro 2021]. Zapotrzebowanie na białko roślinne w krajach Unii Europejskiej jest znacznie większe niż pozyskiwana wysokość plonów nasion roślin strączkowych. Nieunikniony import soi do celów przemysłowych generuje duże koszty. Polska za import poekstrakcyjnej śruty sojowej wydatkuje około 2 mln zł rocznie [Woźniak i Twardowski 2018]. Białko pochodzenia roślinnego jest w dzisiejszych czasach niezwykle ważne w hodowli zwierząt, jak i produkcji żywności. Z tego też względu rośnie powierzchnia uprawy soi w Polsce oraz w innych krajach Unii Europejskiej. Uprawa soi, zwłaszcza w Polsce, ze względów klimatycznych jest jak na razie mało opłacalna, stąd postępujące prace hodowlane dążące do wytworzenia nowych, bardziej tolerancyjnych na krótszy okres wegetacji odmian [Augustyńska i Bębenista 2019].

Warunki klimatyczne Polski zaliczają się do strefy klimatu umiarkowanego ciepłego przejściowego. Roczna suma opadów natomiast wynosi od 300–1000 mm. Wszystko to powoduje, że uprawa soi zwyczajnej w Polsce napotyka wiele trudności [Kop i in. 2007; Dudek 2015]. Rolnictwo zostało zmuszone do podjęcia działań, które spowodują wzrost areалу uprawy roślin strączkowych, a zwłaszcza soi. Uzyskanie wysokiego plonu tego gatunku jest zależne od odpowiednio dobranej odmiany, właściwej agrotechniki oraz warunków klimatycznych [Tyagi i in. 2011].

Wpływ terminu siewu na plonowanie soi

Zdaniem wielu autorów istotnym elementem uprawy soi jest termin wysiewu nasion, który ma wpływ na prawidłowe wykształcanie organów wegetatywnych i generatywnych oraz ostateczny plon [Setiyono i in. 2007; Divito i in. 2016; Nico i in. 2019]. W Polsce siew soi najlepiej wykonywać, gdy średnia dobowa temperatura gleby wynosi powyżej 8°C, czyli zazwyczaj jest to przełom kwietnia i maja. Wysianie soi zbyt wcześnie w nieogrzaną glebę, wpływa na nierównomierne i przedłużone wschody roślin. Z drugiej strony, wczesny termin siewu zwiększa liczbę strąków na roślinie i masę tysiąca nasion w stosunku do plonów uzyskiwanych przy późniejszych terminach [Praczyk 2017]. Przykładowo, średnio-wczesna

odmiana „Aldana” plonuje znacznie niżej w porównaniu do wczesnej odmiany „Merlin” [COBORU 2021].

W prezentowanej pracy opisano wyniki z doświadczeń poletkowych, które miały na celu sprawdzenie, jak termin siewu wpływa na plonowanie trzech odmian soi uprawnej, różniących się wymaganiami pod względem długości sezonu wegetacyjnego. W tych doświadczeniach badano odmiany: „Merlin” – odmiana wczesna, „Abelina” – średnio wczesna i „Petrina” – późna. Doświadczenie to przeprowadzono w okresie trzyletnim, a nasiona wysiewano w terminach od 9. kwietnia do 29. sierpnia. Najbardziej korzystnym terminem siewu, dla odmiany późnej „Petriny”, w którym otrzymano największą liczbę strąków, nasion i ich masy był 21. maja. Warto zaznaczyć, że MTN uzyskana z roślin sianych w tym terminie była podobna do MTN nasion zebranych z roślin wysiewanych 12. kwietnia i 4. maja. Uzyskane wyniki wskazują, że w przypadku późnych odmian soi uprawnej można stosować terminy siewu również w kwietniu, co nie zmniejsza końcowego plonu MTN. Sadeghi i Niyaki [2013] również wykazali, że zastosowanie wczesnego terminu siewu korzystnie wpływa na jakość nasion soi.

Późniejsze terminy siewu tj. czerwcowy i lipcowy, spowodowały zmniejszenie liczby strąków, zmniejszenie liczby strąków, nasion i ich masy. W ostatnim lipcowym terminie nie udało się już zebrać nasion, a w sierpniowym, rośliny zatrzymały się na etapie siewki. Zastosowanie późniejszego terminu siewu wiąże się więc z ryzykiem nieuzyskania plonów. Wysiew nasion w maju może pozwolić na ominięcie występującej często w kwietniu suszy wiosennej, pod warunkiem wystraczającej liczby opadów w maju [Uslu i Esendal 1998; Calviño i in. 2003b; Bastidas i in. 2008]. Opóźnienie siewu o dwa, trzy tygodnie może jednak wiązać się z ryzykiem niedostatecznej ilości wody w okresie letnich upałów, czego efektem są niższe plony [Kumagai i Takahashi 2020]. W przeprowadzonym w niniejszej pracy doświadczeniu, najmniejszą liczbę strąków zebrano z roślin wysiewanych później niż w maju. Ibrahim (2012) wykazał, że głównym wyznacznikiem zmniejszenia plonu przy późnym wysiewie nasion jest mała liczba nasion w strąku.

W analizie plonowania trzech odmian soi, różniących się wymaganiami co do długości sezonu wegetacyjnego, wzięto pod uwagę wskaźnik hydrotermiczny (HTC) obliczony na podstawie miesięcznych temperatur i opadów atmosferycznych, występujących w czasie wzrostu i rozwoju roślin. Warunki pogodowe w poszczególnych miesiącach i latach silnie zróżnicowały otrzymane plony badanych odmian. W przypadku odmiany „Petrina” wysiewanej 4. maja 2018 roku uzyskano najniższe plony nasion (brano pod uwagę liczbę

nasion na roślinę i ich masę) w porównaniu do tych parametrów uzyskanych z roślin wysiewanych 21. maja tego roku. W tym terminie siewu uzyskano najlepsze plony dla tej odmiany. Maj w tym roku, według wskaźnika Sielianinova ($k=1,29$) był dość suchy, a poprzedzał go kwiecień bardzo suchy ($k=0,31$), co miało wyraźny wpływ na uzyskanie gorszego plonu. Nasiona wysiewane w maju „miały” zatem dużo gorszy start w porównaniu do nasion wysiewanych w kwietniu.

W 2019 roku powtórnie badano wpływ terminu siewu na trzy odmiany soi. W tym roku kwiecień był wilgotny, a maj skrajnie wilgotny. W przypadku wczesnego wysiewu 9. kwietnia najlepiej plonowała późna odmiana „Petrina” w porównaniu do wcześniejszych „Abeliny” i „Merlina”. Wynik ten wskazuje, że w przypadku nawet późnych odmian, najważniejszym czynnikiem wpływającym na ich plonowanie jest ilość opadów w początkowym okresie kiełkowania i wzrostu. W przypadku tych samych odmian, w tym samym roku, siew majowy był niekorzystny ze względu na ulewne deszcze, a otrzymane plony były niższe niż uzyskane z roślin wysiewanych w kwietniu. Należy jednak podkreślić, że omawiane warunki pogodowe wpływały na różnice w liczbie strąków, nasion i ich masy przeliczanych na roślinę, natomiast nie miały wpływu na MTN.

W roku 2019 porównywano także plonowanie roślin wysiewanych w tym samym terminie tj. 9. kwietnia w kombinacji bez agrowłókniny i dodatkowo przykrywanych agrowłókniną. Agrowłókninę stosuje się powszechnie do uprawy roślin wcześniej sianych, w celu zabezpieczenia ich przed ewentualnymi przymrozkami i przed nadmiernym parowaniem wody z powierzchni gleby, jak również przed nadmiernym zachwaszczeniem. Ze względu na korzystne warunki termiczno - wilgotnościowe w kwietniu tego roku, przykrywanie roślin agrowłókniną nie wpłynęło na wysokość plonu, w porównaniu do roślin rosnących bez przykrycia. Przykładowo, zastosowanie agrowłókniny wcześniej wysiewanej, wrażliwej na niską temperaturę, kukurydzy cukrowej (w kwietniu), ochroniło ją przed wczesnymi przymrozkami i przyspieszyło zbiór kolb o osiem dni [Rosa 2013].

W 2019 roku rośliny wysiewane 29. sierpnia zatrzymały się w fazie siewki mimo, że zarówno temperatura, jak i dostępność wody były dla soi optymalne w okresie kiełkowania. Być może spadek temperatur we wrześniu, mimo dostatecznej ilości wody, był sygnałem dla roślin, że nie zdążą ukończyć całego okresu rozwojowego. Można by się pokusić zatem o wysunięcie hipotezy, że oprócz temperatury i dostępności wody, dla rośliny istotna jest także zmiana długości dnia, która w okresie wrześniowym zaczyna się zdecydowanie skracać. Na wiosnę w czasie wzrostu roślin, dzień się wydłuża, co roślina może odbierać jako sygnał potencjalnie korzystnego okresu do dalszego wzrostu i rozwoju. W końcu lata następuje

stopniowe skracanie się długości dnia wraz z większymi wahaniami temperatury, co dla soi, jako rośliny dnia krótkiego, może być sygnałem do przejścia w fazę generatywną. Roślina jednak jeszcze nie uzyskała dostatecznego rozwoju wegetatywnego i nie zmagazynowała wystarczającej ilości asymilatów do procesu kwitnienia i zawiązywania nasion. O rozwoju rośliny decyduje oczywiście zespół wszystkich czynników środowiskowych, występujących w odpowiedniej fazie. Inicjacja kwitnienia zależy głównie od fotoperiodu, temperatury i czynników stresowych. Rośliną modelową dnia długiego, na której prowadzone były badania, dotyczące wpływu fotoperiodu na kwitnienie jest *Arabidopsis thaliana*, a dnia krótkiego *Oryza sativa* [Cho i in. 2017]. Ekspresja genów kontrolujących kwitnienie regulowana jest także przez wewnętrzny zegar biologiczny „napędzany” czynnikami indukującymi o charakterze metabolicznym i fizycznym, głównie światłem i dostępnością składników pokarmowych [Kopcewicz 2002]. Na przebieg embriogenezy i kwitnienia, oprócz kontroli genetycznej, mają również wpływ hormony roślinne i regulatory wzrostu, a w szczególności zależność między ich stężeniami. W wytwarzaniu pręcików i słupków zaangażowane są auksyny, gibereliny, cytokininy, poliaminy, kwas abscysynowy, salicylowy i jasmonowy. Bernier i in. [1993] argumentują, że na proces kwitnienia oprócz hormonów wpływają także cukry, głównie sacharoza w liściach, które są donorami składników odżywczych do merystemu wierzchołkowego. Umburanas i in. [2019] podają, że skutki późnego siewu można częściowo zniwelować, zwiększając normę wysiewu nasion. W świetle powyższych rozważań, stwierdzenie tych autorów wydaje się dość dyskusyjne.

W 2020 roku powtórzono doświadczenie przeprowadzone rok wcześniej, wysiewając nasiona w dwóch terminach: kwietniowym, czyli najbardziej popularnym w naszym kraju oraz czerwcowym tzw. późnym. Średnie temperatury występujące od maja do września były podobne do roku poprzedniego. Najlepsze plonowanie roślin wysiewanych w kwietniu odnotowano w przypadku późnej odmiany „Petrina”.

Wpływ szczepionek bakteryjnych na plonowanie soi

Jedną z najważniejszych zalet roślin bobowatych jest wiązanie azotu atmosferycznego z powietrza przez bakterie brodawkowe, które wchodzi w symbiozę z rośliną [Wiśniewska, 2022]. Bakterie pobierają azot atmosferyczny i redukują go do formy amonowej, całkowicie przyswajalnej przez rośliny [Stasiak i in. 2016]. Korzystny wpływ bakterii na plonowanie poprzez inokulowanie nasion szczepionkami bakteryjnymi obserwowali m.in. Jarecki

i Bobrecka-Jamro [2016]. Zastosowanie w produkcji rolniczej preparatów mikrobiologicznych wpływa korzystnie na środowisko, np. przez zmniejszenie dawek nawozów azotowych. Wiązanie azotu przez bakterie wspomaga rozwój roślin na glebach ubogich w ten pierwiastek, bez konieczności stałego nawożenia [Kunert i in. 2016]. W uprawie soi ważną rolę odgrywa zrównoważone nawożenie azotem, ponieważ zbyt intensywne dawkowanie tego składnika może działać ograniczająco na rozwój brodawek lub nawet całkowicie zahamować ich wzrost [Gai i in. 2017; Korsak-Adamowicz i in. 2007; Kumar i in. 2013]. W ostatnich latach opracowano wiele biopreparatów zawierających zliofilizowane, wyselekcjonowane szczepy bakterii symbiotycznych, które wchodząc w układy symbiotyczne z roślinami bobowatymi, pozwalają na ograniczenie nawożenia azotowego. Obecnie na rynku dostępny jest szeroki asortyment preparatów mikrobiologicznych na bazie bakterii brodawkowych.

W niniejszej pracy zastosowano szczepionki bakteryjne dedykowane dla soi od różnych producentów. Wszystkie szczepionki zawierały szczep bakterii *Bradyrhizobium japonicum*. Według producentów, również ilość bakterii była w szczepionkach taka sama. Zróżnicowanie polegało na nośniku, w jakim zawieszono bakterie.

Wpływ szczepionek na plonowanie soi przeprowadzono w doświadczeniu w kilku wariantach. W pierwszym zastosowano trzy szczepionki: Nitraginę Biofood, Nitraginę IUNG i Nitrazę, którymi inokulowano rośliny odmiany „Petrina”. W doświadczeniu tym analizowano wpływ szczepionek na kinetykę fluorescencji chlorofilu *a*, parametry plonowania, zawartość białka w liściach, aktywność reduktazy azotanowej oraz udział azotu atmosferycznego asymilowanego przez bakterie w stosunku do azotu pobieranego z gleby. Szczepionki miały istotny, lecz specyficzny wpływ na wszystkie analizowane parametry fluorescencji chlorofilu *a*. Dane literaturowe, dotyczące wpływu bakterii z rodzaju *Rhizobium* na fotosyntezę są bardzo nieliczne. Z prezentowanych badań wynika, że bakterie *Bradyrhizobium* mają pozytywny wpływ na poszczególne parametry fluorescencji chlorofilu, co może mieć duże znaczenie w uzyskiwaniu większych plonów. Asymilacja wolnego azotu wymaga dużej ilości energii, stąd badania tego rodzaju mogą mieć znaczenie dla rolników uprawiających rośliny z rodziny bobowatych [Tylman i Kowalczyk 2012]. W niniejszej pracy, Nitragina Biofood istotnie zwiększyła strumień energii transportowany poza plastochinon (ET_0/CS_m). Energia ta związana jest z kompleksem enzymatycznym prowadzącym fotodysocjację wody. Proces ten dostarcza większą część protonów wykorzystywanych do syntezy ATP w błonach tylakoidów chloroplastów. Nitragina Biofood wpływała także na maksymalną wydajność fotochemiczną PSII (F_v/F_m), a Nitragina IUNG na

wskaźnik funkcjonowania PSII (PI). Uzyskane wyniki mogą sugerować, że te proste i nieinwazyjne analizy sprawności aparatu fotosyntetycznego mogą pomóc hodowcom i rolnikom w wyborze szczepionki do inokulacji roślin strączkowych.

Wszystkie trzy szczepionki istotnie zwiększyły aktywność reduktazy azotanowej w porównaniu do roślin nieinokulowanych, niezależnie od dostarczanego siarczanu amonowego z izotopem ciężkiego azotu (^{15}N). Jon azotanowy NO_3^- pochodzący z gleby jest redukowany do NH_4^+ dwuetapowo przez jon NO_2^- . Reakcja ta jest katalizowana przez roślinną reduktazę azotanową EC 1.6.6.4. Według wielu doniesień literaturowych, azotany hamują aktywność nitrogenazy w brodawkach korzeniowych [za Lucińskim i in. 2002]. Przeciwny wynik uzyskali Silveira i in. [2001], którzy wykazali, że w liściach fasoli zwyczajnej aktywność reduktazy azotanowej była wyższa niż w korzeniach i wzrastała pod wpływem zwiększenia dawki azotanów w glebie. Efekt ten był z kolei przeciwny do obserwowanego przez tych samych autorów dla innego gatunku fasoli, a mianowicie *Phaseolus lunatus*.

Według doniesień literaturowych, zwiększenie wiązania N_2 jest spowodowane obecnością aktywnej reduktazy azotanowej EC 1.7.99.4 w bakteroidach [Luciński i in. 2002]. Należy podkreślić, że w prezentowanej pracy analizowano aktywność reduktazy azotanowej w liściach, a zatem oznaczana aktywność dotyczyła tylko reduktazy roślinnej. Uzyskany w niniejszej rozprawie wynik jest zatem dość interesujący, bowiem wydawać by się mogło, że zwiększona ilość jonu amonowego, gromadzonego w wyniku asymilacji azotu atmosferycznego przez bakterie, powinna hamować aktywność tego enzymu. W tym doświadczeniu nie nawożono roślin dodatkowo nawozami zawierającymi azotany, aczkolwiek analiza gleby, w której uprawiano soję wykazała obecność tych jonów. Ponadto, dostarczano dodatkową ilość jonów amonowych wraz z $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, co z pewnością zwiększało ich ilość w korzeniach. A te powinny raczej hamować proces redukcji azotanów do tej formy azotu, bowiem jon amonowy jest represorem syntezy reduktazy azotanowej [Gabryś 2002]. Należy zatem przyjąć, że aktywność tego enzymu może być regulowana jeszcze przez inne czynniki endogenne.

W doświadczeniu dotyczącym wpływu szczepionek od różnych producentów nie wykazano zwiększonej zawartości białka ogólnego w liściach odmiany „Petrina”. El i Elsheikh [1999] raportowali, że pod wpływem inokulacji ciecierzycy trzema różnymi szczepionkami *Rhizobium* istotnie wzrósł plon nasion i zawartość białka w nasionach. Autorzy ci jednak nie oznaczali białka w liściach. Podobnie, Sara i in. [2013] podkreślili wpływ inokulacji nasion bakteriami *Rhizobium* na wyższą zawartość białek w nasionach

fasoli. Akumulowanie białka w nasionach jest już etapem końcowym w transporcie pomiędzy organami donorowymi a akceptorowymi i odbywa się praktycznie przy bardzo słabej aktywności bakterii symbiotycznych. Oznaczanie białka w liściach przed rozpoczęciem procesu wypełniania nasion jest widocznie nieadekwatne do końcowego efektu zawartości tych związków w nasionach.

Szczepionki od różnych producentów specyficznie wpływały na parametry plonowania soi, przy czym największy efekt obserwowano w przypadku Nitraginy Biofood i Nitraginy IUNG, które zwiększyły wysokość roślin i liczbę strąków w porównaniu do roślin kontrolnych. Podobny wynik otrzymał Sogut [2006], który po inokulacji bakteriami *Bradyrhizobium* otrzymał większą suchą masę pędów i liści, masę nasion i zwiększoną akumulację azotu.

Udział azotu atmosferycznego w stosunku do azotu pobieranego z gleby

W jednym z doświadczeń niniejszej rozprawy badano udział zasymilowanego azotu atmosferycznego w ogólnym pobieraniu azotu przez soję. W tym celu do podłoża dodawano izotop ^{15}N w postaci siarczanu amonowego – $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Wykonano przy tym kilka analiz wstępnych, w celu stwierdzenia, w jakim stopniu ciężki izotop azotu wpływa na procesy związane z przemianą jonów azotanowych w roślinie oraz plonowanie. Dodanie tego izotopu do podłoża zwiększyło aktywność reduktazy azotanowej, zarówno u roślin kontrolnych (nieinokulowanych), jak i po dodaniu szczepionki Nitraginy IUNG. W przypadku roślin inokulowanych Nitrazą, dodanie ciężkiego azotu obniżyło aktywność tego enzymu w porównaniu do aktywności obserwowanej w roślinach bez tego izotopu, aczkolwiek była ona na poziomie aktywności zarejestrowanej w przypadku roślin inokulowanych Nitraginą IUNG. Uzyskane wyniki nie wskazują zatem na zaburzenie procesu redukcji azotanów pod wpływem ciężkiego azotu. Dodatek tego izotopu do podłoża, w przypadku inokulacji nasion Nitraginą IUNG i Nitrazą, zwiększył plon nasion i ich masę w stosunku do plonu z roślin inokulowanych, ale bez dodatku ^{15}N . Oczywiście, nie sam izotop wywoływał ten efekt, ale dodanie jonów amonowych, choć ilość dodawanego siarczanu amonu była niewielka. Należy też podkreślić, że nie znaleziono danych literaturowych na temat wpływu ciężkiego azotu na plonowanie roślin strączkowych, jak też na temat wpływu szczepionek bakteryjnych na aktywność reduktazy azotanowej.

Wszystkie szczepionki bakteryjne badane w doświadczeniu zwiększyły w liściach

procent azotu pobieranego z powietrza w stosunku do roślin nieinokulowanych. Z kolei analiza azotu w nasionach wykazała drastyczny spadek udziału azotu asymilowanego z powietrza w stosunku do azotu pobieranego z gleby. Inokulacja Nitraginą Biofood, Nitraginą IUNG i Nitrazą zwiększyła istotnie zawartość azotu atmosferycznego w nasionach w stosunku do nasion roślin kontrolnych, nieinokulowanych. Wynik ten potwierdza fakt, że bakterie asymilują azot atmosferyczny najintensywniej na początku kwitnienia [Gabryś 2002] i niewielka ilość tego azotu trafia do nasion pod koniec wegetacji. Największą efektywność redukcji azotu atmosferycznego obserwuje się w fazie kwitnienia, natomiast na początku rozwoju roślin działalność bakterii jest ograniczona.

Roślina pobiera azot głównie z gleby, stąd duże znaczenie ma odpowiednia zasobność gleby pod uprawę soi w ten pierwiastek. W polskich glebach przypadki występowania bakterii brodawkowych są nieliczne i słabo udokumentowane. Najczęściej występują w glebach, na których wcześniej uprawiano już rośliny strączkowe [Martyniuk 2012].

Łagodzenie negatywnych efektów związanych ze stresem suszy

Rośliny uprawiane w warunkach polowych narażone są na wiele czynników stresowych, wywołanych przez niekorzystne warunki pogodowe. Jednym z nich jest bardzo niebezpieczny, zwłaszcza w fazie kiełkowania, niedobór wody. Susza glebowa następuje w wyniku braku opadów atmosferycznych oraz intensywnej ewaporacji powodowanej wysokimi temperaturami. Obecnie susza obniża w świecie plonowanie roślin uprawnych nawet o 75% [Daryanto i in. 2016; Kim i in. 2019]. Od wielu lat pogarsza się bilans wodny w rolnictwie wielu krajów europejskich, w tym także Polski. Występują coraz częściej okresowe susze, które ograniczają wschody, rozwój roślin oraz plonowanie. Zaburzenie gospodarki wodnej w roślinach wpływa na stabilność błony komórkowej, która stanowi kryterium oceny tolerancji roślin na deficyt wody w glebie [Sacała 2007].

Biostymulatory

W ostatnich latach obserwuje się nasilenie również innych niekorzystnych zjawisk klimatycznych np. przymrozki, gwałtowne burze, gradobicia czy ulewne deszcze. Zjawiska te powodują niejednokrotnie ogromne straty w plonach. Producenci rolni poszukują zatem

nowych rozwiązań, które zwiększają tolerancję roślin na suszę, wysokie temperatury, przymrozki, zasolenie oraz ich regenerację po ustąpieniu stresu [Gawrońska i Przybysz 2011]. Jednym z rozwiązań jest stosowanie preparatów należących do tzw. biostymulatorów, które w obecnym rolnictwie coraz częściej stanowią stały element produkcji wielu gatunków rolniczych w uprawie polowej [Kozak 2009; Kozak i in. 2016; Słowiński 2008]. Preparaty te zawierają substancje aktywne, które zwiększają plonowanie poprzez łagodzenie skutków stresu. Wiele publikacji przedstawia korzystne działanie biostymulatorów na plonowanie roślin uprawnych [Gawrońska i Przybysz 2011; Cacak-Pietrzak 2021].

ASAHI SL jest biostymulatorem występującym również pod innymi nazwami tj. Atonik i Chaloperone. W jego skład wchodzi związek fenolowy, które naturalnie występują w roślinach. Okres rozkładu tego preparatu jest szybki (okres półtrwania 1–7 godzin), co powoduje, że nie stanowi on niebezpieczeństwa pozostałości tego biostymulatora zarówno w produktach rolniczych, jak i w środowisku. Wielu autorów potwierdza, że ASAHI SL ma korzystny wpływ na wzrost, wielkość oraz jakość plonu roślin [Gulluoglu i in. 2006; Ochmian i Grajkowski 2007; Černý i in. 2008; Borowski i Blamowski 2009; Haroun i in. 2011, Przybysz i in. 2014; Kocira i in. 2015c; Kocira i in. 2017a]. Zauważono, że zastosowanie ASAHI SL w warunkach stresowych dla roślin ma działanie stymulujące, ale jest uzależnione nie tylko od gatunku rośliny, ale również od odmiany [Gulluoglu i in. 2006; Harasimowicz-Herman i Borowska 2006; Haroun i in. 2011]. Ten biostymulator modyfikuje cechy biometryczne, wydajność i jakość plonu nasion, także u soi uprawnej.

W literaturze światowej bardzo mało jest doniesień na temat wpływu metanolu na plonowanie roślin, jednakże ze względu na doniesienia Behrouzgar i Yarnia (2017), a także wyników uzyskanych przez Kalandyk [2016], zdecydowano się na zastosowanie tego związku w prowadzonych doświadczeniach na soi. Chociaż w 2019 odmiana „Petrina” zareagowała zwiększeniem plonowania pod wpływem metanolu, to w przypadku doświadczenia prowadzonego w 2020 r. obie odmiany „Abelina” i Merlin” wykazały obniżenie badanych parametrów plonu z wyjątkiem MTN. Niewykluczone, że należałoby to doświadczenie powtórzyć, ale stosując mniejsze stężenie metanolu, bowiem w wyższych stężeniach, według Behrouzgar i Yarnia (2017) związek ten może wywoływać toksyczny efekt. Rozbieżność wyników uzyskanych dla tych trzech odmian można tłumaczyć specyficzną reakcją na ten stymulator.

Coraz powszechniej, badany pod kątem korzystnego wpływu na rośliny w czasie oddziaływania stresów środowiskowych, jest rozpuszczalny krzem (Si). Związek ten powoduje zaimpregnowanie epidermy liścia, utwardzając ją i chroniąc przed uszkodzeniami

mechanicznymi, a przez to zmniejszając prawdopodobieństwo porażenia przez choroby i szkodniki [Fauteuxi in. 2005; Robak i Ostrowska 2006; Sacała 2009]. Romero-Aranda i in. [2006] wykazali, że krzem zmniejsza skutki niedoboru wody oraz zwiększa wydajność fotosyntezy. Pilon i in. [2013] i Mehrabanjoubani i in. [2012] stwierdzili, że krzem może mieć korzystny wpływ na odżywianie roślin poprzez zwiększenie absorpcji azotu, fosforu, potasu i cynku. Wiele badań sprawdziło rolę krzemu w łagodzeniu skutków stresów m.in. suszy. Pierwiastek ten jest zaliczany do grupy pierwiastków korzystnych tzw. *beneficial element*. Wyniki badań dowodzą, że krzem w warunkach stresu suszy może zapobiegać degradacji struktury i funkcji błon komórkowych, a także działa jako regulator osmolitów [Sacała 2009]. Doświadczenia polowe przeprowadzone w warunkach glebowych naszego kraju wskazują na korzystny wpływ dolistnej i doglebowej aplikacji krzemu na plonowanie pszenicy jarej w warunkach umiarkowanej wilgotności gleby, jak i w suszy [Kowalska i in. 2020a, b; Sienkiewicz-Cholewa 2021]. W pracach tych autorek udowodniono, że krzem może odgrywać także rolę w procesach antyoksydacyjnych.

Kolejną substancją stymulującą rozwój roślin jest zearalenon (ZEN), nazywany inaczej F2 toksyną, produkowaną przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. Wyniki szeregu badań wykazały, że zearalenon ma również charakter hormonalny i wpływa na wzrost i rozwój różnych gatunków roślin [Biesaga-Kościelniak i Filek 2010; Dziurka i in. 2019]. Vinello i Macri [1978] stwierdzili wzrost aktywności α -amylazy i β -glukozydazy w kielkujących nasionach kukurydzy pod wpływem ZEN. Z kolei Mirocha i in. [1968] obserwowali stymulację powstawania zawiązków wegetatywnych pędów w tkankach kalusowych. Stosowanie tego związku jako substancji stymulującej wzbudzało kontrowersje spowodowane obawami, czy wprowadzanie tej toksyny do środowiska jest bezpieczne. Badania prowadzone przez Biesagę-Kościelniak i Filek [2010] oraz Dziurkę i in. [2019] wykazały, że w stężeniach charakterystycznych dla hormonów, ZEN inicjuje proliferację tkanki kalusowej i różnicowanie komórek, a ponad to może zastępować działanie chłodu w procesie wernalizacji. Zastosowanie tej toksyny w niskich stężeniach nie zagraża zdrowiu zwierząt i ludzi. Nawet najczulsze urządzenia analityczne nie wykrywają obecności zearalenonu w nasionach roślin traktowanych egzogenicznie bardzo niskimi stężeniami tego związku [Dziurka i in. 2019]. Można porównać efekt działania zearalenonu do gibereliny wiele lat temu odkrytej, która pierwotnie była traktowana jak toksyna, wydzielana przez grzyba *Giberella fujikuroi*. Grzyb ten wywołuje u ryżu tzw. chorobę „szalonych siewek”. Obecnie stosuje się giberelinę w ogrodnictwie i w rolnictwie do np. stymulowania kiełkowania nasion, likwidowania cechy karłowatości czy uzyskiwania owoców bezpestkowych [Lewak 2002].

W niniejszej pracy przeprowadzono doświadczenie sprawdzające działanie takich biostymulatorów, jak: ASAHI SL, metanol, krzem czy zearalenon. Doświadczenie poletkowe zostało prowadzone w dwóch następujących po sobie latach 2019 i 2020. W pierwszym roku uprawiano odmianę „Petrina” i użyto wszystkich wymienionych biostymulatorów. Warunki pogodowe w tym roku były niekorzystne ze względu na skrajnie suchy czerwiec oraz suchy lipiec i sierpień. Wbrew oczekiwaniom wszystkie zastosowane substancje stymulujące, z wyjątkiem krzemu, obniżyły otrzymany plon. Krzem natomiast zwiększył masę tysiąca nasion w porównaniu do roślin kontrolnych i roślin opryskiwanych pozostałymi stymulatorami.

Ze względu na korzystne warunki pogodowe efekt biostymulatorów analizowano głównie pod kątem zwiększenia plonowania, a nie łagodzenia stresu. Obie odmiany „Abelina” i „Merlin” reagowały specyficznie na poszczególne stymulatory. Zwiększenie plonu obserwowano po zastosowaniu krzemu i zearalenonu u odmiany „Abelina”, a w przypadku odmiany „Merlin” taki efekt wywołał tylko zearalenon. W badaniach Płażek i in. [2017] wykazano, że cztery gatunki zbóż (pszenica twarda, pszenica zwyczajna, kukurydza i sorgo) reagowały specyficznie na działanie ZEN, stosowanego w celu łagodzenia stresu solnego. Związek ten częściej obniżał świeżą i suchą masę pędów i korzeni w porównaniu do innych stymulatorów, choć w niektórych przypadkach wywoływał efekt zmniejszenia skutków tego stresu.

W doświadczeniu prowadzonym w tym samym roku (2020) wykonano analizę profilu hormonalnego w liściach roślin soi „Abeliny” i „Merlina” w trzech terminach po aplikacji metanolu, krzemu i zearalenonu. Zmiany hormonalne pod wpływem stymulatorów zachodziły specyficznie dla każdej odmiany. W przypadku obu odmian największy wpływ zastosowanych stymulatorów obserwowano po pierwszym tygodniu po opryskach. Efekt działania stymulatorów na poziom hormonów zdecydowanie zmniejszał się po dwóch i trzech tygodniach. Największy wzrost zawartości kwasu abscysynowego i salicylowego u obu badanych odmian obserwowano pod wpływem krzemu. Hormony te mają duże znaczenie w reakcji odpornościowej roślin na stres suszy oraz na inne stresy abiotyczne [Handro i in. 1997; Li i in. 2000; MacRobbie 2000; Milborrow 2001; Zhou i in. 2005; Kaydan i in. 2007; Ikegami i in. 2009; Khandelwal i in. 2010]. Uzyskane wyniki wskazują na potencjalnie pozytywne, łagodzące działanie krzemu na rośliny rosnące w stresie osmotycznym, co potwierdza wcześniejsze wyniki uzyskane przez Sienkiewicz-Cholewy [2021]. Z kolei istotny wzrost zawartości kwasu jasmonowego u obu odmian, pod wpływem działania metanolu wskazuje na toksyczny efekt tego alkoholu, co tłumaczyłoby obserwowane

obniżenie plonowania soi pod wpływem tego związku. Kwas jasmonowy jest bowiem m.in. hormonem stresu zranienia, a wzrost jego stężenia w tkankach może świadczyć o naruszeniu ściany komórkowej i błon cytoplazmatycznych [Ruan i in. 2019].

Wpływ szczepionek

Plonowanie

Możliwość łagodzenia skutków suszy badano na trzech odmianach soi „Malaga”, „Merlin” i „Petrina”. Nasiona inokulowano sześcioma szczepionkami pochodzącymi od różnych producentów: HiStick® Soy, Nitragina-Biofood, Nitragina-IUNG, Nitroflora Mycoflor, *Rhizobium* Bio-Gen. Susza spowodowała spadek plonowania przede wszystkim u roślin nieinokulowanych wszystkich badanych odmian. Zastosowanie szczepionek zwiększyło parametry plonowania zarówno w roślinach optymalnie nawadnianych, jak i w suszy, przy czym, zazwyczaj rośliny rosnące w stresie suszy plonowały na podobnym poziomie, co rośliny dobrze nawodnione. Można zatem przyjąć, że wszystkie szczepionki łagodziły skutki suszy, ale różniły się efektem zwiększania liczby strąków, nasion i ich masy w porównaniu do roślin kontrolnych tj. nieinokulowanych. Największy wzrost plonowania uzyskano po zastosowaniu Nitraginy Biofood i Nitraginy IUNG, a przede wszystkim rośliny inokulowane tymi szczepionkami wytworzyły największą liczbę brodawek. Ekspresję genów *NOD21*, *NIC1* i *NORKb*, inicjujących nodulację badano w korzeniach tylko jednej odmiany „Malaga”. Największe zróżnicowanie pomiędzy szczepionkami w indukcji ekspresji tych genów wykryto w przypadku genu *NIC1*. Największą liczbę kopii transkryptów w stosunku do kontroli tj. roślin nieinokulowanych, uzyskano dla tego genu pod wpływem szczepionki HiStick® Soy. Analizując jednak liczbę brodawek i elementy plonowania pod wpływem różnych szczepionek, nie znaleziono powiązania pomiędzy tymi parametrami a ekspresją tego genu indukowaną właśnie tą szczepionką. Nitragina Biofood i Nitragina IUNG, dające najlepsze efekty pod względem plonowania i nodulacji, obniżały wręcz ekspresję nie tylko genu *NIC1*, ale także *NOD21* i *NORKb*. Ekspresja genu *NIC1* była silnie hamowana przez szczepionki Nitragina IUNG i Nitragina Biofood a stymulowana głównie przez HiStick® Soy. Według Wang i in. [2020] *Bradyrhizobium* hamuje ekspresję genu *NIC1*, uzyskane wyniki mogą zatem sugerować, że w Nitraginie IUNG i Nitraginie Biofood bakterie *Bradyrhizobium* były bardziej aktywne niż w pozostałych zastosowanych szczepionkach, stąd silne hamowanie ekspresji badanych genów pod ich wpływem. Biorąc pod uwagę doniesienia, ile genów jest zaangażowanych w cały proces nawiązywania kontaktu korzeni z bakteriami i tworzenia brodawek [Tylman i Kowlaczyk 2012; De Mita i in. 2007], można

przyjąć, że geny wybrane do analiz genetycznych w tej pracy, nie miały większego wpływu na nodulację i wysokość plonu wybranej odmiany „Malaga”.

Wydajność fotochemiczna

Łagodzący efekt suszy na wydajność fotochemiczną aparatu fotochemicznego poprzez inokulację szczepionkami zaobserwowano głównie w przypadku odmiany „Malaga”. Maksymalna wydajność fotochemiczna (F_v/F_m), strumień energii transportowanej poza plastochinon (ET_o/CS_m) oraz wskaźnik funkcjonowania PSII (PI) zwiększyły się istotnie w warunkach suszy pod wpływem zastosowanych szczepionek, przy czym wartości F_v/F_m oraz ET_o/CS_m zwiększyły się pod wpływem Nitroflory Mycoflor, HiStick[®] Soy i *Rhizobium* Bio-gen, natomiast wskaźnik PI zwiększył się w suszy pod wpływem Nitroflory Mycoflor, HiStick[®] Soy i *Rhizobium* Bio-Gen. Tak szerokiego pozytywnego wpływu szczepionek na parametry fluorescencji nie obserwowano w przypadku pozostałych odmian, aczkolwiek szczepionka *Rhizobium* Bio-Gen częściej zwiększała wartości ET_o/CS_m i PI u odmiany „Merlin” i „Petrina” w porównaniu do innych szczepionek. Kibido i in. [2020] raportowali łagodzenie stresu suszy u soi pod wpływem szczepionek z bakteriami *Rhizobium* sp. Bakterie symbiotyczne poprawiły co prawda nodulację, ale nie miały bezpośredniego wpływu na poprawę plonowania w tym stresie. Z kolei Hussain i in. [2014] obserwowali, że *Rhizobium leguminosarum*, *Mesorhizobium ciceri* i *Rhizobium phaseoli* poprawiły wzrost, długość korzeni, przyrost biomasy i tolerancję na suszę siewek pszenicy.

Szczepionki wpływały również na aktywność reduktazy azotanowej zarówno w warunkach optymalnego nawadniania, jak i w suszy. Również pod tym względem, badane odmiany reagowały specyficznie na inokulację różnymi szczepionkami. Najlepszy efekt łagodzenia skutków suszy wykazała szczepionka HiStick[®] Soy, ale tylko dla odmiany „Merlin”. Latrach i in. [2014] wykazali łagodzący wpływ trzech szczepów *Rhizobium* skutków stresu w roślinach lucerny siewnej, rosnących w zasolonej glebie, także pod względem zwiększenia wydajności fotochemicznej PSII.

Stres oksydacyjny

Przeprowadzone badania dotyczyły również wpływu suszy i ewentualnie łagodzącego wpływu szczepionek na występowanie stresu oksydacyjnego. Badano zarówno stężenie nadtlenu wodoru, jak i aktywność takich enzymów antyoksydacyjnych, jak katalaza,

peroksydaza niespecyficzna czy dysmutaza anionorodnika ponadtlenkowego. Susza generalnie zwiększyła zawartość nadtlenu wodoru u odmiany „Malaga” i „Petrina”, natomiast w przypadku odmiany „Merlin” stężenie tego związku w roślinach w suszy było istotnie mniejsze niż w roślinach optymalnie podlewanych. Zastosowane szczepionki bakteryjne głównie zwiększyły stężenie nadtlenu wodoru w roślinach optymalnie nawadnianych, a zwłaszcza u odmiany „Merlin”. Nie obserwowano natomiast istotnego wpływu szczepionek na podniesienie zawartości H_2O_2 w warunkach suszy u odmiany „Malaga” i „Merlin”, w porównaniu do roślin kontrolnych – nieinokulowanych. Efekt ten natomiast był widoczny u odmiany „Petrina”. Wynik ten wskazuje na zróżnicowaną tolerancję badanych odmian na deficyt wody w glebie oraz zróżnicowaną reakcję na działanie szczepionek.

W literaturze znajduje się wiele doniesień o wzroście produkcji reaktywnych form tlenu w reakcji roślin na suszę [Bowler i in. 1992; Foyer i in. 1994; Alscher i in. 1997; Shigeoka i in. 2002]. Nadtlenek wodoru jest uważany za cząsteczkę sygnałową kontrolującą wiele reakcji odpornościowych na stresy biotyczne i abiotyczne [Nazir i in. 2020]. W przypadku stresu suszy jego działanie może być pozytywne w reakcji zamykania aparatów szparkowych, co ogranicza transpirację [Ishibashi i in. 2011]. Autorzy ci badali pozytywny wpływ łagodzenia stresu suszy przez nadtlenek wodoru podawany egzogennie na liście soi uprawnej. W prezentowanej rozprawie nie znaleziono jednak korelacji pomiędzy stężeniem nadtlenu wodoru w liściach w warunkach suszy a zmianami w świeżej i suchej masie roślin.

Wzrost stężenia nadtlenu wodoru pociąga zazwyczaj za sobą wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych, głównie peroksydazy i katalazy [Mittler 2002; Vranova i in. 2002; Pandhair i Eshkon 2006; Ahmad i in. 2008]. Podobnie, jak w przypadku reduktazy azotanowej, odmiany soi reagowały specyficznie na wpływ suszy niezależnie od stosowanych szczepionek. Aktywność katalazy była podobna we wszystkich trzech odmianach soi. Pod wpływem suszy zarówno w roślinach kontrolnych tj. nieinokulowanych, jak i traktowanych szczepionkami, odnotowano spadek aktywności tego enzymu. Wyjątkiem były rośliny odmiany „Petrina” inokulowane szczepionką *Rhizobium* Bio-Gen, w których obserwowano wzrost aktywności katalazy. W pozostałych roślinach tej odmiany inokulowanych innymi szczepionkami, z wyjątkiem Nitraginy Biofood, aktywność tego enzymu w suszy była drastycznie niższa. Miało to duże znaczenie na obserwowane większe stężenie nadtlenu wodoru w warunkach suszy właśnie u tej odmiany. Podobny efekt pod wpływem tego stresu obserwowali w roślinach soi Shoukun i in. [2019]. Takács i in. [2018] odnotowali wzrost aktywności katalazy pod wpływem bakterii *Bradyrhizobium japonicum* dodawanych

bezpośrednio do brodawek w warunkach suszy. Podobne wyniki uzyskali Hussain i in. [2014], którzy obserwowali większą aktywność katalazy indukowanej przez rizobia.

Aktywność peroksydazy niespecyficzej była dużo niższa w warunkach suszy i nie znaleziono korelacji pomiędzy aktywnością tego enzymu a stężeniem nadtlenu wodoru. Również nie znaleziono istotnego wpływu poszczególnych szczepionek na aktywność peroksydazy. W roślinach nieinokulowanych, pod wpływem suszy aktywność peroksydazy niespecyficzej wzrosła tylko u jednej odmiany „Malaga”. Wynik ten również potwierdza zróżnicowaną reakcję poszczególnych odmian soi na stres suszy. Takács i in. [2018] wykazali wzrost aktywności POX pod wpływem suszy w roślinach soi różnych odmian. Autorzy ci nie badali jednak wpływu bakterii *Rhizobium* na aktywność tego enzymu.

Aktywność dysmutazy anionorodnika ponadtlenu zależała od zastosowanej szczepionki oraz suszy. Wzrost aktywności SOD w roślinach optymalnie nawadnianych wzrastała głównie pod wpływem szczepionki HiStick® Soy, Nitroflora IUNG i Nitroflora Mycoflor. Susza najsilniej obniżała aktywność tego enzymu w roślinach odmiany „Malaga” i „Petrina”. Również w przypadku SOD widać wyraźne różnice w reakcji badanych odmian na stres suszy i inokulację. Podobne wyniki zaobserwowano w badaniach prowadzonych na roślinach soi, w których dłuższa susza powodowała spadek aktywności SOD w tkankach badanych roślin [Shoukun i in. 2019]. Wyniki wskazują, że zarówno susza, jak i bakterie wywołują w roślinach soi silny stres oksydacyjny. Indukcja stresu oksydacyjnego pod wpływem suszy jest szeroko udokumentowana w literaturze naukowej [Moran i in. 1994; Hasanuzzaman i in. 2013; Hussain i in. 2019]. Infekcja korzeni roślin strączkowych przez bakterie *Rhizobium* sp. traktowana jest przez roślinę na początku wnikania nici infekcyjnej w głąb tkanki jak infekcja patogenami chorobotwórczymi [Bhattacharya i in. 2010]. W reakcji na tę infekcję roślina produkuje RFT, jak też może dochodzić do zwiększonej aktywności enzymów antyoksydacyjnych [Husain i in. 2014].

Biomasa i relatywna zawartość wody (RWC)

O ile w roślinach poddanych suszy świeża masa istotnie zmniejszała się u wszystkich badanych odmian soi, o tyle nie stwierdzono u nich istotnego spadku suchej masy. Zmiany w świeżej masie roślin istotnie korelowały ze zmianami wskaźnika RWC, który w warunkach suszy u wszystkich badanych odmian istotnie się zmniejszył. Ishibashi i in. [2011] obserwowali w suszy większą zawartość wody w tkankach soi pod wpływem egzogenicznie

podawanego nadtlenu wodoru, co było związane z przymykaniem aparatów szparkowych. Chowdhury i in. [2017] uznali RWC za parametr wielkości stresu suszy u roślin soi. W prezentowanych badaniach nie znaleziono jednak zależności pomiędzy stężeniem nadtlenu wodoru a RWC. W przypadku wszystkich trzech badanych odmian w niniejszej pracy parametr ten nie różnicował stopnia tolerancji na suszę, jak również zastosowane szczepionki nie miały wpływu na stopień uwodnienia tkanek soi. Wynik ten jest odmienny od uzyskanego przez Aliasgharza i in. [2006], którzy obserwowali większą wartość RWC w roślinach soi infekowanej przez *B. japonicum* rosnących suszy.

Dyskryminacja węgla ^{13}C

W prezentowanej pracy analizowano także wpływ suszy na reutilizację dwutlenku węgla w obrębie tkanek soi metodą oceny dyskryminacji węgla ^{13}C w stosunku do węgla ^{12}C . Wskaźnik ten można uznać za wskaźnik natężenia stresu suszy oraz wpływ stopnia przymykania aparatów szparkowych na oddalone skutki niedoboru wody w roślinie. Zaobserwowano, że wartość wskaźnika dyskryminacji izotopu ^{13}C pod wpływem suszy wzrastała we wszystkich trzech badanych organach: liściach, strąkach i nasionach. W roślinach w fazie kwitnienia i zawiązywania strąków, w okresie suszy, większa ilość składników zapasowych w nasionach powstaje w warunkach przymkniętych szparek w liściach. Największą wartość tego wskaźnika odnotowano w liściach, a mniejszą w strąkach oraz nasionach. Jest to efektem intensywniejszego „recyklingu” wewnątrztkankowego dwutlenku węgla, zawierającego izotop ^{13}C , i jego ponowną asymilację w organach oddalonych od liści. Efekt ten jest widoczny zarówno w liściach, jak i w strąkach, a nawet w nasionach, jako zmniejszenie stopnia dyskryminacji izotopu węgla ^{13}C . Oznacza to, że stopień dyskryminacji węgla ^{13}C zależy wprawdzie w decydującym stopniu od aktywności RuBisCo, ale także od stopnia rozwarcia aparatów szparkowych i od wentylacji (wymiany gazowej) organów oddalonych od liści (łodyga, strąki, nasiona). W badaniach Kalandyk [2016] obserwowano, jak różne gatunki roślin strączkowych reagują na suszę i stwierdzono, że zarówno poszczególne gatunki, jak i odmiany reagowały na suszę glebową zwiększeniem wartości współczynnika dyskryminacji izotopu węgla ^{13}C . Różnice te spowodowane były odmienną budową anatomiczną poszczególnych gatunków roślin strączkowych, np. soja ma liście i łodygi grube i silnie owłosione, natomiast groch ma te organy dużo cieńsze. Grubość epidermy i włoski ograniczają transpirację, co ma duże znaczenie dla uwodnienia tkanek [Kacperska 2002].

Asymilacja wolnego azotu

W badaniach dotyczących wpływu suszy na plonowanie roślin soi zastosowano także analizę w tkankach soi izotopu ciężkiego azotu, pobieranego z gleby. Pobór pierwiastków z gleby odbywa się ze strumieniem transpiracyjnym. W stresie suszy następuje przymknięcie aparatów szparkowych, co ma decydujący wpływ na intensywność transpiracji i pobór pierwiastków. Analiza procentowego udziału azotu pochodzącego z biologicznego wiązania (przez bakterie symbiotyczne) wykazała, że susza miała istotny wpływ na zwiększenie udziału azotu atmosferycznego zarówno w liściach, jak i w nasionach, w stosunku do azotu pobranego z gleby. Interesującym wynikiem jest, że w suszy, azotu zasymilowanego przez bakterie w strąkach było istotnie mniej niż w roślinach kontrolnych – optymalnie nawadnianych. Wynik ten można tłumaczyć dystrybucją asymilatów w okresie zawiązywania nasion. Asymilacja azotu atmosferycznego przez bakterie brodawkowe odbywa się najsilniej w okresie kwitnienia i ten azot jest wbudowywany w masę rośliny. Asymilacja N₂ jest zdecydowanie mniejsza w czasie powstawania strąków i nasion, stąd też do nasion transportowane są asymilaty powstałe w późniejszym okresie, przy dużo słabszej aktywności bakterii brodawkowych [Gabryś 2002].

8. Wnioski

1. Późne odmiany soi uprawnej można stosować w kwietniowych terminach siewu, co nie zmniejsza końcowego plonu MTN. Także w przypadku późnych odmian soi, najważniejszym czynnikiem wpływającym na ich plonowanie jest ilość opadów w początkowym okresie kiełkowania i wzrostu. Oprócz temperatury i dostępności wody, dla rośliny istotna jest także zmiana długości dnia, która przy późnym siewie sierpniowym zaczyna się zdecydowanie skracać, co hamuje wzrost roślin. Na wiosnę, w czasie wzrostu roślin dzień się wydłuża, co roślina może odbierać jako sygnał potencjalnie korzystnego okresu do dalszego wzrostu i rozwoju. Ze względu na większe plonowanie nasion, odmiana „Petrina” jest warta polecenia do uprawy we wcześniejszych terminach siewu.
2. Bakterie brodawkowe *Bradyrhizobium japonicum* mają istotny wpływ na poszczególne parametry fluorescencji chlorofilu, głównie odzwierciedlające przepływ energii w fotosystemie II, co ma duże znaczenie w uzyskiwaniu większych plonów. Wpływ szczepionek od różnych producentów na plonowanie soi jest specyficzny, przy czym największy wpływ ma Nitragina Biofood i Nitragina IUNG, które zwiększają wysokość roślin i liczbę strąków w porównaniu do roślin nieinokulowanych. Analiza kinetyki fluorescencji chlorofilu *a* może być przydatnym narzędziem w wyborze szczepionek bakteryjnych stosowanych w uprawie roślin strączkowych.
3. Aktywność reduktazy azotanowej w liściach soi uprawnej wzrasta pod wpływem wszystkich zastosowanych szczepionek bakteryjnych. Zwiększona ilość jonów amonowych, gromadzonego w wyniku asymilacji azotu atmosferycznego przez bakterie, nie hamuje aktywności tego enzymu. Biorąc pod uwagę, że jon amonowy działa represyjnie na aktywność reduktazy azotanowej, należy sądzić, że jest ona regulowana także przez inne czynniki endogenne.
4. Wszystkie badane szczepionki bakteryjne wykorzystane w doświadczeniu zwiększają w liściach procent azotu asymilowanego z powietrza w stosunku do azotu pobranego z gleby przez korzenie. Udział azotu pobranego z powietrza w całkowitej puli tego pierwiastka jest dużo mniejszy w nasionach niż w liściach soi uprawnej.

5. Krzem zwiększa masę tysiąca nasion soi w porównaniu do roślin kontrolnych i roślin opryskiwanych pozostałymi stymulatorami.
6. Największy wpływ biostymulatorów na profil hormonalny w liściach soi ujawnia się po pierwszym tygodniu po opryskach. Efekt ten słabnie z każdym kolejnym tygodniem. Największy wzrost zawartości kwasu abscysynowego i salicylowego następuje pod wpływem krzemu, co wskazuje na potencjalnie pozytywne, łagodzące działanie krzemu na rośliny rosnące w stresie osmotycznym. Wzrost zawartości kwasu jasmonowego pod wpływem metanolu skutkuje obniżeniem plonowania, sugerując toksyczne działanie tego alkoholu na rośliny w zastosowanym stężeniu (12%).
7. Susza powoduje spadek plonowania w roślinach nieinokulowanych szczepionkami bakteryjnymi wszystkich badanych odmian. Zastosowanie szczepionek zwiększa istotnie plon roślin zarówno optymalnie nawadnianych, jak i uprawianych warunkach suszy. Szczepionki łagodzą efekt stresu suszy w roślinach soi uprawnej.
8. Szczepionki Nitragina Biofood i Nitragina IUNG stymulują powstawanie największej liczby brodawek korzeniowych. Największej ekspresji pośród badanych genów nodulacji u odmiany „Malaga” ulega gen *NICI* pod wpływem szczepionki HiStick® Soy. Szczepionki Nitragina Biofood i Nitragina IUNG najsilniej zwiększają nodulację i plonowanie, ale najsilniej obniżają ekspresję genu *NICI*, *NOD21* i *NORKb*. W świetle doniesień literaturowych, że bakterie *Bradyrhizobium* obniżają ekspresję genu *NICI*, należy przypuszczać, że aktywność tych bakterii jest większa w szczepionkach Nitragina Biofood i Nitragina IUNG niż w szczepionce HiStick® Soy.
9. Susza oraz inokulacja szczepionkami *Bradyrhizobium* wywołuje stres oksydacyjny w roślinach soi uprawnej. Badane odmiany soi wykazują zróżnicowaną tolerancję na suszę. Petrina jest najbardziej odporną odmianą soi na suszę pod względem większości parametrów plonowania. Zastanawiającym wynikiem jednak jest, że MTN u tej odmiany była istotnie niższa niż u pozostałych badanych odmian. Największą MTN wykazuje w warunkach suszy odmiana „Malaga”.

- 10.** Dyskryminacja izotopu ^{13}C pod wpływem suszy wzrasta w liściach, strąkach i nasionach. Największa dyskryminacja występuje w liściach, a mniejsza w strąkach oraz nasionach. Jest to efektem intensywniejszego „recyklingu” wewnątrztkankowego dwutlenku węgla, zawierającego izotop ^{13}C . Stopień dyskryminacji węgla ^{13}C zależy w decydującym stopniu od aktywności enzymu RuBisCo, oraz od stopnia rozwarcia aparatów szparkowych i wentylacji (wymiany gazowej) organów oddalonych od liści.
- 11.** Susza zwiększa udział azotu atmosferycznego zarówno w liściach, jak i w nasionach w stosunku do azotu pobranego z gleby, co jest związane ze zmniejszonym strumieniem transpiracyjnym przy bardziej przymkniętych aparatach szparkowych. Udział azotu atmosferycznego w nasionach jest mniejszy niż w liściach, co jest spowodowane mniejszą aktywnością bakterii asymilujących azot w okresie wypełniania nasion w porównaniu do pierwszych stadiów rozwojowych roślin.

9. Streszczenie

Soja zwyczajna (*Glycine max* L.) jest cenną rośliną z rodziny *Fabaceae* ze względu na dużą zawartość białka oraz zbalansowany skład aminokwasów. Nasiona są wykorzystywane w przemyśle spożywczym, a śruta do produkcji pasz. Ze względu na okresowe przymrozki, coraz częstsze susze oraz krótki okres wegetacji w stosunku do wymagań tego gatunku, krajowa uprawa soi nie pokrywa zapotrzebowania na ten produkt. Każdy region rolniczy charakteryzujący się specyficznym mikroklimatem, wymaga stosowania odmian soi o większej tolerancji na stresy środowiskowe, a zwłaszcza na niską temperaturę i suszę.

Celem niniejszej rozprawy było sprawdzenie, czy w obliczu zachodzących zmian klimatycznych jest możliwa uprawa średnio-późnych i późnych odmian soi w warunkach polskiego klimatu. W pracy podjęto też temat wykorzystania biostymulatorów w celu zwiększenia plonowania soi. Badano również wpływ szczepionek *Bradyrhizobium japonicum* od różnych producentów, na rośliny pod względem wiązania wolnego azotu, plonowania, a także łagodzenia stresu suszy. W warunkach suszy badano stopień dyskryminacji węgla ^{13}C w celu sprawdzenia nasilenia recyklingu dwutlenku węgla w procesie fotosyntezy, pochodzącego z oddychania. Ponadto, przeprowadzono analizę ekspresji genów nodulacji: *NIC1*, *NOD21* i *NORKb* pod wpływem szczepionek.

Badania przeprowadzono w ramach czterech doświadczeń w latach 2018–2020. Rośliny uprawiano na poletkach doświadczalnych lub w wazonach w warunkach otwartego tunelu foliowego. W doświadczeniu sprawdzającym, jak termin siewu wpływa na plonowanie odmian bardzo wczesnych („Merlin”), średnio-wczesnych („Abelina”), późnych („Malaga”) i bardzo późnej („Petrina”) soi, stosowano wysiew nasion od 9. kwietnia do 29. sierpnia. Analizę wyników tego doświadczenia oparto na współczynniku hydrotermicznym Sielianinowa wyliczanego na podstawie miesięcznej sumy opadów i temperatur dla każdego okresu wegetacyjnego. Ze względu na większe plonowanie nasion bardzo późna odmiana „Petrina” okazała się warta polecenia do uprawy we wcześniejszych (kwietniowych) terminach siewu.

W doświadczeniach zastosowano następujące szczepionki zawierające *B. japonicum*: Nitraginę IUNG, Nitraginę Biofood, Nitrazę, *Rhizobium* Bio-Gen i HiStick® Soy. Wszystkie szczepionki zwiększały plonowanie nasion soi, przy czym największy efekt obserwowano po inokulacji Nitraginą IUNG i Nitraginą Biofood. Wyższe plonowanie roślin było możliwe między innymi poprzez zwiększenie udziału azotu atmosferycznego asymilowanego przez bakterie w stosunku do azotu pobieranego przez korzenie. W tym eksperymencie

zastosowano izotop ^{15}N . W doświadczeniu badającym wpływ suszy na plonowanie odmian „Malaga”, „Merlin” i „Petrina” wykazano efekt łagodzenia skutków suszy przez wszystkie zastosowane szczepionki. Wpływ szczepionek od różnych producentów na plonowanie soi był specyficzny, ale największy wpływ miały Nitragina Biofood i Nitragina IUNG. Aktywność reduktazy azotanowej w liściach soi uprawnej wzrastała pod wpływem wszystkich zastosowanych szczepionek bakteryjnych. W liściach i nasionach, szczepionki zwiększyły udział azotu asymilowanego z powietrza w stosunku do azotu pobranego z gleby, jednakże udział azotu pobranego z powietrza w nasionach był dużo mniejszy niż w liściach.

W badaniach dotyczących wpływu biostymulatorów na plonowanie soi wykorzystano komercyjny preparat ASAHI SL, zearalenon (związek o charakterze hormonalnym produkowany przez grzyby z rodzaju *Fusarium*), metanol i krzem. Jedynie krzem zwiększył masę tysiąca nasion w porównaniu do roślin kontrolnych. Najsilniejszy wpływ biostymulatorów na profil hormonalny w liściach soi ujawnił się po pierwszym tygodniu po oprysku. Największy wzrost zawartości kwasu abscysynowego i salicylowego nastąpił pod wpływem krzemu, co wskazuje na jego potencjalne działanie łagodzące na rośliny rosnące w stresie. Susza obniżyła istotnie plonowanie roślin wszystkich badanych odmian nieinokulowanych szczepionkami bakteryjnymi. Szczepionki złagodziły efekt stresu suszy, zwiększając plon do poziomu plonowania uzyskanego w roślinach optymalnie nawadnianych. W suszy we wszystkich badanych organach wskaźnik dyskryminacji ^{13}C wzrastał, tj. było mniej tego izotopu niż w tkankach roślin optymalnie nawadnianych, co wskazywało na większy stopień przemykania szparek. Największa dyskryminacja ^{13}C występowała w liściach, a mniejsza w strąkach i nasionach. Był to efekt intensywniejszego „recyklingu” wewnątrztkankowego dwutlenku węgla, zawierającego izotop ^{13}C i jego ponowną asymilację w organach oddalonych od liści. W suszy stwierdzono również istotne zwiększenie udziału azotu pobieranego przez bakterie *Bradyrhizobium* w liściach oraz w nasionach, co wiązało się ze zmniejszonym strumieniem transpiracyjnym przy bardziej przymkniętych aparatach szparkowych.

Największej ekspresji spośród badanych genów nodulacji u odmiany „Malaga” uległ gen *NICI* pod wpływem szczepionki HiStick[®] Soy. Nitragina Biofood i Nitragina IUNG najsilniej zwiększyły liczbę brodawek korzeniowych i plonowanie, jednocześnie obniżając ekspresję trzech genów badanych genów. Biorąc pod uwagę, że bakterie z rodzaju *Bradyrhizobium* działają hamująco na ekspresję genu *NICI*, należy przyjąć, że aktywność bakterii w tych dwóch szczepionkach była większa niż w szczepionce HiStick[®] Soy.

10. Abstract

Soybean (*Glycine max* L.) is a valuable plant from the *Fabaceae* family. It contains high protein and balanced composition of amino acids. The seeds of soybean are used in the food industry and in the production of fodder. Due to periodic ground frosts, more frequent droughts and a short growing season in relation to the requirements of this species, in Poland soybean cultivation is insufficient for the demand for this product. Each agricultural region, characterized by a specific microclimate, requires the use of soybean cultivars which are more tolerant to environmental stresses, especially to low temperature and drought.

The aim of this dissertation was to check whether, in the face of the ongoing climate changes, it is possible to cultivate medium-late and late soybean cultivars under Polish climate conditions. The effect of biostimulators on increasing soybean yield and tolerance to periodic drought was also estimated. The effect of *Bradyrhizobium japonicum* inoculants from various producers on plants in terms of fixation of free nitrogen, yielding and drought stress alleviation was also investigated. Under drought conditions, the ^{13}C discrimination was evaluated to check the increase in the recycling of carbon dioxide produced by respiration photosynthesis process. Moreover, an analysis of the expression of nodulation genes: *NICI*, *NOD21* and *NORKb* under the influence of inoculants was performed.

The research was carried out as part of four experiments in the years 2018 – 2020. Plants were grown in the experimental plots or in the pots under an open foil tunnel conditions. In the experiment checking effect of the sowing date on the yielding of very early ("Merlin"), medium-early ("Abelina"), late ("Malaga") and very late ("Petrina") soybean cultivars, seeds were sown from the 9th April to the 29th August. The results of this experiment were analysed using the Sielianinow hydrothermal coefficient calculated on the basis of the monthly sum of precipitation and temperatures for each growing season. Due to the higher yielding of seeds, the very late cv. "Petrina" was to be recommended for cultivation in the earlier (April) sowing dates. In the experiments the following inoculants containing *B. japonicum* were used: Nitragina IUNG, Nitragina Biofood, Nitraza, *Rhizobium* Bio-Gen and HiStick® Soy. All inoculants increased the soybean seed yield, with the greatest effect obtained by Nitragina IUNG and Nitragina Biofood. Higher yield of plants was possible, i.a. by increasing ratio of atmospheric nitrogen assimilated by bacteria in relation to nitrogen taken up by the roots. The ^{15}N isotope was used in this experiment. The effect of drought on the yielding of the cultivars "Malaga", "Merlin" and "Petrina", as well as drought mitigation by all the inoculants used was demonstrated. The impact of bacteria from different producers

on soybean yielding was specific, but *Nitragina* Biofood and *Nitragina* IUNG had the greatest influence. The activity of nitrate reductase in soybean leaves increased under the influence of all applied bacterial inoculants. In the leaves and seeds, the bacteria increased the ratio of nitrogen absorbed from the air in relation to nitrogen taken up by the roots, however, the amount of nitrogen absorbed from the air was much lower in the seeds than in the leaves.

In the studies on the influence of biostimulants on soybean yielding, the commercial compound ASAHI SL, zearalenone (a hormonal compound produced by *Fusarium* fungi), methanol and silicon were applied. Only silicon increased the mass of a thousand seeds compared to that of the control plants. The strongest impact of biostimulants on the hormonal profile in the soybean leaves was revealed after the first week after spraying. The greatest increase in abscisic and salicylic acid content occurred under the treatment silicon, which indicates its potential mitigating effect on plants growing under stress. The drought significantly reduced the yield of plants of all studied cultivars not inoculated with bacteria. The inoculants abolished the effect of drought stress, increasing the yield to the level of yield obtained from optimally irrigated plants. In drought, the ^{13}C discrimination index increased in all the examined organs, i.e. there was less amount of this isotope than in the tissues of optimally irrigated plants, which indicated a greater degree of stomata closing. The greatest discrimination was in the leaves and it was less in the pods and seeds. It was the result of more intensive "recycling" of intra-tissue carbon dioxide containing the ^{13}C isotope and its reassimilation in organs distant from the leaves. Under drought stress, there was also a significant greater participation of nitrogen taken up by *Bradyrhizobium* bacteria in the leaves and seeds was determined, which was associated with a reduced transpiration flux by more closed stomata.

The *NIC1* gene under the HiStick® Soy inoculant was most expressed among the nodulation genes studied in the "Malaga" cultivar. *Nitragina* Biofood and *Nitragina* IUNG increased the number of root nodules and yield the most, but they reduced the expression of three studied genes. Taking into account that *Bradyrhizobium* inhibits the expression of the *NIC1* gene, it should be assumed that the activity of the bacteria in these two inoculants was greater than in the HiStick® Soy one.

11. Literatura

- Ahmad P., Sarwat M., Sharma S. 2008. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology* 51: 167-173.
- Aliasghar zad N., Neyshabouri M.R., Salimi G. 2006. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium japonicum* on drought stress of soybean. *Biologia* 61: 324-328.
- Alves B.J.R., Boddey R.M., Urquiaga S. 2003. The success of BNF in soybean in Brazil. *Plant and Soil* 252: 1-9.
- Anderson E.J., Ali M.L., Beavis W.D., Chen P., Clemente T.E., Diers B.W., Graef G.L., Grassini P., Hyten D.L., McHale L.K. 2019. Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] breeding: history, improvement, production and future opportunities. [W:] Al-Khayri J., Jain S., Johnson D. (red.), *Advances in plant breeding strategies: Legumes*. Springer. Cham: 431-516.
- Anuradha S., Rao S.S.R. 2007. The effect of brassinosteroids on radish (*Raphanus sativus* L.) seedlings growing under cadmium stress. *Plant Soil and Environment* 53: 465-472.
- Arnholdt-Schmitt B., Costa J.H., de Melo D.F. 2006. AOX - a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? *Trends in Plant Science* 11: 281-287.
- Ashraf M., Harris P.J.C. 2013. Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica* 51: 163-190.
- 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: 15-30.
- Augustynska I., Bebenista A. 2019. Ekonomiczne aspekty uprawy soi i łubinu słodkiego w Polsce. *Problemy Rolnictwa Światowego* 19: 256–268.
- Baker N.R., Rosenqvist E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55: 1607-1621.
- Behrouz yar E.K., Yarnia M. 2017. The effect of foliar application of methanol on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in drought conditions. *Annals of Warsaw University of Life Sciences-SGGW. Horticulture and Landscape Architecture* 38: 27–33.
- Bergmann W. 1992. Nutritional disorders of plants: visual and analytical diagnosis. *Colour Atlas* Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart . New York.
- Bernier G., Havelange A., Houssa C., Petitjean A., Lejeune P. 1993. Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell* 5: 1147-1155.

- Bethlenfalvay G.J., Franson R.L. 1989. Manganese toxicity alleviated by mycorrhizae in soybean. *Journal of Plant Nutrition* 12: 953-970.
- Bhattacharya A., Sood P., Citovsky V. 2010. The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular Plant Pathology* 11: 705-719.
- Biesaga-Kościelniak J. 2001. Zearalenon, jako nowy, hipotetyczny regulator wzrostu i rozwoju roślin. Monografia 10 (rozprawa habilitacyjna). Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.
- Boczar P. 2016. Znaczenie gospodarcze soi oraz możliwości rozwoju jej produkcji w Polsce. *Zeszyty Naukowe Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Problemy Rolnictwa Światowego* 16: 35–48.
- Borowski E., Blamowski Z.K. 2009. The effects of triacontanol 'TRIA' and Asahi SL on the development and metabolic activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants treated with chilling. *Folia Horticulturae* 21: 39-48.
- Budzyński W., Dubis B., Jankowski A. 2008. Response of winter oilseed rape to the biostimulator Asahi SL applied in spring. [W:] Dąbrowski Z.T. (red.), Monographs series: Biostimulators in modern agriculture, Field Crop. . *Wieś Jutra*. Warszawa: 47-55.
- Černý I., Pačuta V., Kovar M. 2008. Yield and quality of chicory (*Cichorium intybus* L.) in dependence on variety and foliar application of Atonik and Polybor 150. *Journal of Central European Agriculture* 9: 425-430.
- Cetner M., Dąbrowski P., Samborska I., Łukasik I., Swoczyna T., Pietkiewicz S., Bąba W., Kalaji H. 2016. Zastosowanie pomiarów fluorescencji chlorofilu w badaniach środowiskowych. *Kosmos* 65: 197-205.
- Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S. 2003. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239-264.
- Chmielniak T., Popowicz J., Sarnecki W. 2009. Koncepcja układu produkcji metanolu zintegrowanego ze zgazowaniem węgla brunatnego. *Górnictwo i Geoinżynieria* 33: 69-77.
- Cho L.-H., Yoon J., An G. 2017. The control of flowering time by environmental factors. *Plant Journal* 90: 708-719.
- Chowdhury J., Karim M., Khaliq Q., Ahmed A., Mondol A.M. 2017. Effect of drought stress on water relation traits of four soybean genotypes. *SAARC Journal of Agriculture* 15: 163-175.

- Ciereszko I. 2002. Regulacyjna rola cukrów, percepcja cukrów i przekazywanie sygnału w komórkach roślinnych. *Postępy Biologii Komórki* 29: 269-289.
- COBORU 2019. Lista odmian roślin rolniczych wpisanych do krajowego rejestru w Polsce. http://www.coboru.pl/Publikacje_COBORU/Listy_odmian/lo_rolnicze_2019.pdf
- Cramer G.R., Urano K., Delrot S., Pezzotti M., Shinozaki K. 2011. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *Bmc Plant Biology* 11: 163.
- Czekała B. 2016. Mączki mięsno-kostne. Kiedy powrót? <https://www.topagrar.pl/articles/zywienie-swin/maczki-miesno-kostne-kiedy-powrot/> (dostęp styczeń 2019)
- Davies P. 2004. Plant hormones-biosynthesis, signal transduction, action. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Davies W.J., Metcalfe J., Lodge T.A., Dacosta A.R. 1986. Plant growth substances and the regulation of growth under drought. *Australian Journal of Plant Physiology* 13: 105-125.
- De Mita S., Ronfort J., McKhann H.I., Poncet C., El Malki R., Bataillon T. 2007. Investigation of the demographic and selective forces shaping the nucleotide diversity of genes involved in nod factor signaling in *Medicago truncatula*. *Genetics* 177: 2123-2133.
- Debnath M., Pandey M., Bisen P.S. 2011. An omics approach to understand the plant abiotic stress. *Omics-a Journal of Integrative Biology* 15: 739-762.
- Dizdaroglu M., Jaruga P. 2012. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research* 46: 382-419.
- Djanaguiraman M., Sheeba J.A., Devi D.D., Bangarusamy U. 2005. Response of cotton to Atonik and TIBA for growth, enzymes and yield. *Journal of Biological Sciences* 5: 158-162.
- Dodd A.N., Kudla J., Sanders D. 2010. The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology* 61: 593-620.
- Dziurka M., Janeczko A., Juhász C., Gullner G., Oklestková J., Novák O., Saja D., Skoczowski A., Tóbiás I., Barna B. 2016. Local and systemic hormonal responses in pepper leaves during compatible and incompatible pepper-tobamovirus interactions. *Plant Physiology and Biochemistry* 109: 355-364.
- El Hadi E.A., Elsheikh E.A.E. 1999. Effect of Rhizobium inoculation and nitrogen fertilization on yield and protein content of six chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars in marginal soils under irrigation. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 54: 57-63.

- Exley C. 1998. Silicon in life: a bioinorganic solution to bioorganic essentiality. *Journal of Inorganic Biochemistry* 69: 139-144.
- Farrar J., Pollock C., Gallagher J. 2000. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Science* 154: 1-11.
- Fauteux F., Remus-Borel W., Menzies J.G., Belanger R.R. 2005. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *Fems Microbiology Letters* 249: 1-6.
- Fenta B.A., Beebe S.E., Kunert K.J., Burrige J.D., Barlow K.M., Lynch J.P., Foyer C.H. 2014. Field phenotyping of soybean roots for drought stress tolerance. *Agronomy* 4: 418-435.
- Fu J., Huang B., Zhang G. 2000. Physiological and biochemical changes during seed filling in relation to leaf senescence in soybean. *Biologia Plantarum* 43: 545-548.
- Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 436-442.
- Gabryś H. 2007. Gospodarka azotowa. [W:] Lewak S., Kopcewicz J. (red.), *Fizjologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa: 246 – 258.
- 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: 280-300.
- Gai Z., Zhang J., Li C. 2017. Effects of starter nitrogen fertilizer on soybean root activity, leaf photosynthesis and grain yield. *Plos One* 12: e0174841.
- Gasch A.P. 2007. Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast* 24: 961-976.
- Gaweł E. 2011. Rola roślin motylkowych drobnonasiennych w gospodarstwie rolnym. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie* 11: 73-91.
- Gawronaka H. 2008. Biostimulators in modern agriculture. General aspects. *Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego*. Warszawa.
- Gawrońska H., Przybysz A. 2011. Biostymulatory: mechanizmy działania i przykłady zastosowań. "Targi Sadownictwa i Warzywnictwa". Warszawa. Agrosimex Sp. z o.o.:
- Gechev T.S., Hille J. 2005. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *Journal of Cell Biology* 168: 17-20.
- Gechev T.S., Van Breusegem F., Stone J.M., Denev I., Laloi C. 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death.

- Bioessays 28: 1091-1101.
- Gibson S.I. 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 93-102.
- Gisladottir G., Stocking M. 2005. Land degradation control and its global environmental benefits. *Land Degradation & Development* 16: 99-112.
- Govindjee 2004. Chlorophyll a fluorescence: a bit of basics and history. [W:] Papageorgiou G.C., Govindjee (red.), *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis* Springer. Dordrecht: 1-42.
- Graham P.H., Vance C.P. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 131: 872-877.
- Gretel G.m., Daimy C., Freixas J., Guevara E., Meira S., González-Anta G., Ferreira A. 2011. Signals in soybean's inoculants. [W:] Tzi-Bun N. (red.), *Soybean-Biochemistry, Chemistry and Physiology*. IntechOpen. 323-344.
- Grzesiak S., Filek W., Skrudlik G., Pieńkowski S. 1996. Międzyodmianowe zróżnicowanie reakcji na działanie suszy kilku gatunków roślin strączkowych. "Ekofizjologiczne aspekty reakcji roślin na działanie abiotycznych czynników stresowych". Kraków 275-277.
- Gulluoglu L., Arioglu H., Arslan M. 2006. Effects of some plant growth regulators and nutrient complexes on above-ground biomass and seed yield of soybean grown under heat-stressed environment. *Journal of Agronomy* 5: 126-130.
- Halliwell B. 2000. A super way to kill cancer cells? *Nature Medicine* 6: 1105-1106.
- Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322.
- Handro W., Mello C.M., Manzano M., Floh E.I. 1997. Enhancement of stem elongation and flower bud regeneration by salicylic acid. *Fascículos: Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 9: 139-142.
- Harasimowicz-Herman G., Borowska M. 2006. Efekty działania biostymulatora Asahi SL w uprawie rzepaku ozimego w zależności od warunków pluwiotermicznych. *Rośliny Oleiste* 1: 95-106.
- Hasanuzzaman M., Nahar K., Gill S.S., Fujita M. 2013. Drought stress responses in plants, oxidative stress, and antioxidant defense. [W:] Tuteja N., Gill S.S. (red.), *Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim: 209-250.
- Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K., Bohnert H.J. 2000. Plant cellular and molecular

- responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 463-499.
- Hatfield J.L., Sauer T.J., Prueger J.H. 2001. Managing soils to achieve greater water use efficiency: a review. *Agronomy Journal* 93: 271-280.
- He G.-H., Hou L., Li D.-M., Luo X.-Y., Niu G.-Q., Tang M., Pei Y. 2002. Prediction of yield and yield components in hybrid rice by using molecular markers. *Yi Chuan xue bao=Acta Genetica Sinica* 29: 438-444.
- Heiserman D.L. 1997. Księga pierwiastków chemicznych. Prószyński i S-ka, str.: 56-62, 67-71, 120-124. Warszawa.
- Hura T., Dziurka M., Hura K., Ostrowska A., Dziurka K., Gadzinowska J. 2017. Wheat and rye genome confer specific phytohormone profile features and interplay under water stress in two phenotypes of triticale. *Plant Physiology and Biochemistry* 118: 494-509.
- Hussain M.B., Zahir Z.A., Asghar H.N., Asgher M. 2014. Can catalase and exopolysaccharides producing rhizobia ameliorate drought stress in wheat? *International Journal of Agriculture and Biology* 16: 3-13.
- Hussain S., Rao M.J., Anjum M.A., Ejaz S., Zakir I., Ali M.A., Ahmad N., Ahmad S. 2019. Oxidative stress and antioxidant defense in plants under drought conditions. [W:] Hasanuzzaman M., Hakeem K.R., Nahar K., Alharby H.F. (red.), *Plant Abiotic Stress Tolerance*. Springer. Cham: 207-219.
- IUNG 2010. System Monitoringu Suszy Rolniczej w Polsce. http://iung.pl/index.php?option=com_content&view=article&id=142:suszaa&catid=45:oferta&Itemid=111.
- Jankiewicz L. 1984. Fizjologia roślin sadowniczych. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa.
- Jarecki W., Bobrecka-Jamro D. 2015. Wpływ nawożenia dolistnego na plon i skład chemiczny nasion soi [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Fragmenta Agronomica* 32: 22-31.
- Jarecki W., Bobrecka-Kamro D. 2016. Reakcja roślin soi na szczepienie nasion nitraginą oraz nawożenie startowe azotem. *Nauka Przyroda Technologie* 10: 1-12.
- Jarecki W., Buczek J., Bobrecka-Jamro D. 2016. Response of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] to bacterial soil inoculants and foliar fertilization. *Plant Soil and Environment* 62: 422-427.
- Jaspers P., Kangasjarvi J. 2010. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiologia Plantarum* 138: 405-413.
- Kacperska A. 2002. Gospodarka wodna. [W:] Lewak S., Kopcewicz J. (red.), *Fizjologia roślin*.

Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa: 192 – 227.

- Kalaji H.M., Rastogi A., Zivcak M., Brestic M., Daszkowska-Golec A., Sitko K., Alsharafa K.Y., Lotfi R., Stypinski P., Samborska I.A., Cetner M.D. 2018. Prompt chlorophyll fluorescence as a tool for crop phenotyping: an example of barley landraces exposed to various abiotic stress factors. *Photosynthetica* 56: 953-961.
- Kalaji H.M., Schansker G., Ladle R.J., Goltsev V., Bosa K., Allakhverdiev S.I., Brestic M., Bussotti F., Calatayud A., Dabrowski P., Elsheery N.I., Ferroni L., Guidi L., Hogewoning S.W., Jajoo A., Misra A.N., Nebauer S.G., Pancaldi S., Penella C., Poli D., Pollastrini M., Romanowska-Duda Z.B., Rutkowska B., Serodio J., Suresh K., Szulc W., Tambussi E., Yanniccari M., Zivcak M. 2014. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynthesis Research* 122: 121-158.
- Kalinowski M. 2018. Lista zalecanych odmian ubinu żółtego <https://www.tygodnik-rolniczy.pl/articles/uprawa/lista-zalecanych-odmian-lubinu-zoltego/?page=1#lead> (dostęp luty 2019)
- Kapusta F. 2012. Rośliny strączkowe źródłem białka dla ludzi i zwierząt (Legumes are a source of protein for humans and animals). *Engineering Sciences & Technologies/Nauki Inżynierskie i Technologie* 1: 16-32.
- Kaydan D., Yagmur M., Okut N. 2007. Effects of salicylic acid on the growth and some physiological characters in salt stressed wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agricultural Sciences-Tarim Bilimleri Dergisi* 13: 114-119.
- Kende H., Zeevaart J.A.D. 1997. The five "classical" plant hormones. *Plant Cell* 9: 1197-1210.
- Khripach V., Zhabinskii V., De Groot A. 2000. Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Annals of Botany* 86: 441-447.
- Kibido T., Kunert K., Makgopa M., Greve M., Vorster J. 2020. Improvement of rhizobium-soybean symbiosis and nitrogen fixation under drought. *Food and Energy Security* 9.
- Kidaj D., Wielbo J., Skorupska A. 2012. Nod factors stimulate seed germination and promote growth and nodulation of pea and vetch under competitive conditions. *Microbiological Research* 167: 144-150.
- Kocira A., Kocira S., Stryjecka M. 2015. Effect of Asahi SL application on common bean yield. "Farm Machinery and Processes Management in Sustainable Agriculture. 7th International Scientific Symposium". Gembloux, Belgium. Agriculture and

- Agricultural Science Procedia 103-107.
- Kocira A., Kocira S., Świeca M., Złotek U., Jakubczyk A., Kapela K. 2017. Effect of foliar application of a nitrophenolate-based biostimulant on the yield and quality of two bean cultivars. *Scientia Horticulturae* 214: 76-82.
- Kocira A., Świeca M., Kocira S., Złotek U., Jakubczyk A. 2018. Enhancement of yield, nutritional and nutraceutical properties of two common bean cultivars following the application of seaweed extract (*Ecklonia maxima*). *Saudi Journal of Biological Sciences* 25: 563-571.
- Kocira S., Kocira A., Kornaś R., Koszel M., Szmigielski M., Krajewska M., Szparaga A., Krzysiak Z. 2018. Effects of seaweed extract on yield and protein content of two common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Legume Research* 41: 589-593.
- Kocira S., Kocira A., Szmigielski M., Piecak A., Sagan A., Malaga-Tobola U. 2015. Effect of an amino acids-containing biostimulator on common bean crop. *Przemysł Chemiczny* 94: 1732-1736.
- Kocira S., Sujak A., Kocira A., Wójtowicz A., Oniszczyk A. 2015. Effect of Fylloton application on photosynthetic activity of Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.). "Farm Machinery and Processes Management in Sustainable Agriculture. 7th International Scientific Symposium". Gembloux, Belgium. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 108-112.
- Kocira S., Szparaga A., Kocira A., Czerwińska E., Depo K., Erlichowska B., Deszcz E. 2019. Effect of applying a biostimulant containing seaweed and amino acids on the content of fiber fractions in three soybean cultivars. *Legume Research* 42: 341-347.
- Kocira S., Szparaga A., Kocira A., Czerwińska E., Wójtowicz A., Bronowicka-Mielniczuk U., Koszel M., Findura P. 2018. Modeling bio-metric traits, yield and nutritional and antioxidant properties of seeds of three soybean cultivars through the application of biostimulant containing seaweed and amino acids. *Frontiers in Plant Science* 9: 388.
- Kopcewicz J. 2002. Rytm biologiczne roślin. [W:] Lewak S., Kopcewicz J. (red.), *Fizjologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa: 601 – 611.
- Korsak-Adamowicz M., Starczewski J., Dopka D. 2007. Oddziaływanie niektórych zabiegów agrotechnicznych na brodawkowanie soi. *Fragmenta Agronomica* 24: 232-237.
- Korsak-Adamowicz M., Starczewski J., Dopka D. 2007. Oddziaływanie niektórych zabiegów agrotechnicznych na brodawkowanie soi. *Fragmenta Agronomica* 24: 232-237.
- Kouril R., Zygadlo A., Arteni A.A., de Wit C.D., Dekker J.P., Jensen P.E., Scheller H.V., Boekema E.J. 2005. Structural characterization of a complex of photosystem I and

- light-harvesting complex II of *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* 44: 10935-10940.
- Kozak M. 2009. Biostymulator-dobry wybor. *Agrotechnika. Poradnik Rolnika* 3: 61-62.
- Kozak M., Wondolowska-Grabowska A., Serafin-Andrzejewska M., Gniadzik M., Kozak M.K. 2016. Bio-stymulatory – wczoraj, dziś i jutro. [W:] Łuczycka D. (red.), *Rolnictwo XXI wieku – problemy i wyzwania. Idea Knowledge Future*. Wrocław: 114–122.
- Kreps J.A., Wu Y.J., Chang H.S., Zhu T., Wang X., Harper J.F. 2002. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology* 130: 2129-2141.
- Kumar C.V., Vaiyapuri K., Amanullah M.M., Gopalaswamy G. 2013. Influence of foliar spray of nutrients on yield and economics of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Journal of Biological Sciences* 13: 563-565.
- Kunert K.J., Vorster B.J., Fenta B.A., Kibido T., Dionisio G., Foyer C.H. 2016. Drought stress responses in soybean roots and nodules. *Frontiers in Plant Science* 7: 1015.
- Lambers H., Chapin F.S., Pons T.L. 2008. *Plant physiological ecology*, 2nd edn. Springer. New York
- Laranjo M., Alexandre A., Oliveira S. 2014. Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiological Research* 169: 2-17.
- Latrach L., Farissi M., Mouradi M., Makoudi B., Bouizgaren A., Ghoulam C. 2014. Growth and nodulation of alfalfa-rhizobia symbiosis under salinity: Electrolyte leakage, stomatal conductance, and chlorophyll fluorescence. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 38: 320-326.
- Lee D.J., Zeevaart J.A.D. 2002. Differential regulation of RNA levels of gibberellin dioxygenases by photoperiod in spinach. *Plant Physiology* 130: 2085-2094.
- Leite V.M., Rosolem C.A., Rodrigues J.D. 2003. Gibberellin and cytokinin effects on soybean growth. *Scientia Agricola* 60: 537-541.
- Lewak S. 2002. Regulacja procesów fizjologicznych przez czynniki endogenne. [W:] Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa: 137-161.
- Li J., Cang Z., Jiao F., Bai X., Zhang D., Zhai R. 2017. Influence of drought stress on photosynthetic characteristics and protective enzymes of potato at seedling stage. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 16: 82-88.
- Liang W., Ma X., Wan P., Liu L. 2018. Plant salt-tolerance mechanism: a review. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495: 286-291.

- Lichtenthaler H.K. 2007. Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids, alpha-tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance. *Photosynthesis Research* 92: 163-179.
- Long S.R. 1999. Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. *Plant Cell* 8: 1885.
- Lorenc-Kozik A.-M., Pisulewska E. 2003. Wpływ zróżnicowanego nawożenia azotem i mikroelementami na plonowanie wybranych odmian soi. *Rośliny Oleiste* 24: 131-142.
- Lovegrove A., Hooley R. 2000. Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends in Plant Science* 5: 102-110.
- Luboinski A., Markowicz M. 2017. Wpływ systemu nawożenia azotem na plonowanie trzech odmian soi [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Fragmenta Agronomica* 34: 66-75.
- Lucinski R., Polcyn W., Ratajczak L. 2002. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium* - legumes. *Acta Biochimica Polonica* 49: 537-546.
- Madadkhah E., Lotfi M., Nabipour A., Rahmanpour S., Banihashemi Z., Shoorooei M. 2012. Enzymatic activities in roots of melon genotypes infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis race 1. *Scientia Horticulturae* 135: 171-176.
- Mahajan S., Tuteja N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444: 139-158.
- Maksymowicz A. 2016. Wykorzystanie nowych regulatorów w kształtowaniu produktywności wybranych roślin uprawnych (rozprawa doktorska). Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.
- Marciniak K., Świeżawska B., Kęsy J., Tretyn A., Kopcewicz J. 2012. Gibereliny-percepcja i transdukcja sygnału u roślin. *Postępy Biologii Komórki* 39: 24-47.
- Marschner H. 1998. Mineral nutrition of higher plants. Academic press. London, Waltham, San Diego.
- Marty F. 1997. The biogenesis of vacuoles: insights from microscopy. [W:] Leigh R.A., Sanders D., Callow J.A. (red.), *Advances in Botanical Research*, Vol. 25. Elsevier. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto: 1-42.
- Martyniuk S. 2008. The importance of biological fixation of atmospheric nitrogen in ecological agriculture. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* 53: 9-14.
- Martyniuk S. 2011. Skuteczne i nieskuteczne preparaty mikrobiologiczne stosowane w ochronie i uprawie roślin oraz rzetelne i nierzetelne metody ich oceny. *Postępy Mikrobiologii* 50: 321-328.

- Martyniuk S. 2012. Naukowe i praktyczne aspekty symbiozy roślin strączkowych z bakteriami brodawkowymi. *polish Journal of agronomy* 9: 17-22.
- Matyjaszczyk E. 2015. The introduction of biostimulants on the Polish market. The present situation and legal requirements. *Przemysł Chemiczny* 94: 1841-1844.
- Mehrabanjoubani P., Abdolzadeh A., Sadeghipour H.R., Aghdasi M. 2015. Silicon affects transcellular and apoplastic uptake of some nutrients in plants. *Pedosphere* 25: 192-201.
- Michalski T., Horoszkiewicz-Janka J., Bartos-Spychała M. 2008. Skuteczność Asahi SL w ochronie mieszanki jęczmienia z pszenicą w porównaniu do siewów czystych. [W:] Dąbrowski Z.T. (red.), *Biostymulatory w nowoczesnej uprawie. Wieś Jutra*. Warszawa: 50-59.
- Michałek W., Sawicka B. 2005. Zawartość chlorofilu i aktywność fotosyntetyczna średnio późnych odmian ziemniaka w warunkach pola uprawnego w środkowo-wschodniej Polsce. *Acta Agrophysica* 6: 183-195.
- Mirocha C.J., Christensen C.M., Nelson G.H. 1968. Physiologic activity of some fungal estrogens produced by *Fusarium*. *Cancer Research* 28: 2319-2322.
- Mirshekari B. 2013. Spraying of soybeans with nitrogenous fertilizers at earlier flowering stage: an ecofriendly fertilization management system to improve crop yield. *Legume Research* 36: 318-322.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Mittler R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* 11: 15-19.
- Mitura K., Cacak-Pietrzak G. 2021. Wpływ biostymulatorów na plonowanie i jakość ziarna zbóż. "Konferencja 4 Żywioty – Współczesne Problemy w Naukach o Życiu". Lublin.
- Mok D.W.S., Mok M.C. 2001. Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 89-118.
- Morgan P.W., Drew M.C. 1997. Ethylene and plant responses to stress. *Physiologia Plantarum* 100: 620-630.
- Morkunas I., Woźniak A., Van Chung M., Rucińska-Sobkowiak R., Jeandet P. 2018. The role of heavy metals in plant response to biotic stress. *Molecules* 23.
- Munoz-Azcarate O., Gonzalez A.M., Santalla M. 2017. Natural rhizobial diversity helps to reveal genes and QTLs associated with biological nitrogen fixation in common bean. *Aims Microbiology* 3: 435-466.

- Murkowski A. 2002. Oddziaływanie czynników stresowych na luminescencje chlorofilu w aparacie fotosyntetycznym roślin uprawnych. *Acta Agrophysica* 61: 1-158.
- Mutasa-Goettgens E., Hedden P. 2009. Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *Journal of Experimental Botany* 60: 1979-1989.
- Myśliwa-Kurdziel B., Gabruk M. 2011. Biosynteza chlorofilu: dwa mechanizmy redukcji protochlorofilidu. *Kosmos* 60: 435-444.
- Nadeem S.M., Ahmad M., Zahir Z.A., Javaid A., Ashraf M. 2014. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances* 32: 429-448.
- Nawracała J. 2016. Wstęp. [W:] Filoda G., Mrówczyński M. (red.), *Metodyka integrowanej ochrony i produkcji soi*. Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy. Poznań: 7-9.
- Nazir F., Fariduddin Q., Khan T.A. 2020. Hydrogen peroxide as a signalling molecule in plants and its crosstalk with other plant growth regulators under heavy metal stress. *Chemosphere* 252: 126486.
- Nowak A., Wróbel J. 2010. Wpływ egzogennych regulatorów wzrostu na zawartość barwników asymilacyjnych w liściach trzech odmian soi zwyczajnej [*Glycine max* (L.) Merr]. *Rośliny Oleiste* 31: 351-359.
- Ochmian I., Grajkowski J. 2007. Influence of three biostimulants on yielding and fruit quality of three primocane raspberry cultivars. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus* 6: 29-36.
- Oldroyd G.E.D., Harrison M.J., Paszkowski U. 2009. Reprogramming plant cells for endosymbiosis. *Science* 324: 753-754.
- Oldroyd G.E.D., Murray J.D., Poole P.S., Downie J.A. 2011. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. [W:] Bassler B.L., Lichten M., Schupbach G. (red.), *Annual Review of Genetics*, Vol 45, Vol. 45, *Annual Review of Genetics*. 119-144.
- Pandhair V., Sekhon B. 2006. Reactive oxygen species and antioxidants in plants: An overview. *Journal of plant Biochemistry and Biotechnology* 15: 71-78.
- Park R., Epstein S. 1961. Metabolic fractionation of C13 and C12 in plants. *Plant Physiology* 36: 133-138.
- Parry A.D., Griffiths A., Horgan R. 1992. Abscisic acid biosynthesis in roots: II. the effects of water-stress in wild-type and abscisic-acid-deficient mutant (*notabilis*) plants of *Lycopersicon esculentum* Mill. *Planta* 187: 192-197.
- Paul M., Pellny T., Goddijn O. 2001. Enhancing photosynthesis with sugar signals. *Trends in*

- Plant Science 6: 197-200.
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2002-2007.
- Pierozan C., Jr., Favarin J.L., Munhoz de Almeida R.E., de Oliveira S.M., Lago B.C., Ocheuze Trivelin P.C. 2015. Uptake and allocation of nitrogen applied at low rates to soybean leaves. *Plant and Soil* 393: 83-94.
- Pilon C., Soratto R.P., Moreno L.A. 2013. Effects of soil and foliar application of soluble silicon on mineral nutrition, gas exchange and growth of potato plants. *Crop Science* 53: 1605-1614.
- Płażek A., Dubert F., Kopeć P., Dziurka M., Kalandyk A., Pastuszak J., Waligórski P., Wolko B. 2018. Long-term effects of cold on growth, development and yield of narrow-leaf lupine may be alleviated by seed hydropriming or butenolide. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 2416.
- Ponczek M.B., Wachowicz B. 2005. Oddziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu z białkami. *Postępy Biochemii* 51: 140-145.
- Pusz W., Plaskowska E. 2008. Wpływ stosowania preparatu Asahi SL na zdrowotność rzepaku ozimego. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*: 185–191.
- Raj S.P., Solomon P.R., Thangaraj B. 2022. *Fabaceae*. [W:], *Biodiesel from Flowering Plants*. Springer. Singapore: 291-363.
- Rasheed A., Xia X. 2019. From markers to genome-based breeding in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 132: 767-784.
- Robak J., Ostrowska A. 2006. Najważniejsze zagrożenia chorobami małoobszarowych upraw warzyw i potencjalne możliwości ich zwalczania. *Progress in Plant Protection* 46: 114-120.
- Rodriguez M.C.S., Petersen M., Mundy J. 2010. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 61: 621-649.
- Rogers H., Munné-Bosch S. 2016. Production and scavenging of reactive oxygen species and redox signaling during leaf and flower senescence: similar but different. *Plant Physiology* 171: 1560-1568.
- Romero-Aranda M.R., Jurado O., Cuartero J. 2006. Silicon alleviates the deleterious salt effect on tomato plant growth by improving plant water status. *Journal of Plant Physiology* 163: 847-855.
- Rosa R. 2013. Wpływ terminu siewu i przykrycia gleby agrowłókniną na wzrost i długość okresu wegetacji kukurydzy cukrowej uprawianej w warunkach wschodniej Polski.

- Science, Nature, Technologies/Nauka, Przyroda, Technologie 7: 1-15.
- Rosenqvist E., van Kooten O. 2003. Chlorophyll fluorescence: a general description and nomenclature. [W:] De Ell J.R., Toivonen P.M.A. (red.), Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology. Springer. New York: 31-77.
- Ruan J., Zhou Y., Zhou M., Yan J., Khurshid M., Weng W., Cheng J., Zhang K. 2019. Jasmonic acid signaling pathway in plants. International Journal of Molecular Sciences 20: 2479.
- Rynek pasz. Stan i perspektywy. IERiGŻ -PIB, KOWR, MRiRW nr 40, Warszawa, 20, 21, 30-31. <https://www.gov.pl/web/rolnictwo/rynek-pasz-notowania-za-okres-kwiecien-maj-2018-r>.
- Sacala E. 2009. Role of silicon in plant resistance to water stress. Journal of Elementology 14: 619-630.
- Sacala E., Demczuk A., Grzys E., Parylak D. 2004. Wpływ boru na aktywność reduktazy azotanowej oraz wzrost siewek pszenżyta. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 502: 333-339.
- Safdar H., Amin A., Shafiq Y., Ali A., Yasin R., Shoukat A., Hussan M.U., Sarwar M.I. 2019. A review: impact of salinity on plant growth. Natural Sciences 17: 34-40.
- Samia A.H., Wafaa M.S., Mohamed A.A., Amr M.M. 2011. Growth and physiological responses of *Solanum lycopersicum* to atonik and benzyl adenine under vernalized conditions. Journal of Ecology and the Natural Environment 3: 319-331.
- Sánchez-Pardo B., Fernández-Pascual M., Zornoza P. 2012. Copper microlocalisation, ultrastructural alterations and antioxidant responses in the nodules of white lupin and soybean plants grown under conditions of copper excess. Environmental and Experimental Botany 84: 52-60.
- Sara S., Morad M., Reza C. 2013. Effects of seed inoculation by *Rhizobium* strains on chlorophyll content and protein percentage in common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). International Journal of Biosciences 3: 1-8.
- Sauer M., Robert S., Kleine-Vehn J. 2013. Auxin: simply complicated. Journal of Experimental Botany 64: 2565-2577.
- Selosse M.A., Le Tacon F. 1998. The land flora: a phototroph-fungus partnership? Trends in Ecology & Evolution 13: 15-20.
- Semane B., Cuypers A., Smeets K., Van Belleghem F., Horemans N., Schat H., Vangronsveld J. 2007. Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: glutathione metabolism and antioxidative defence system. Physiologia Plantarum 129: 519-528.

- Sheu S.S., Nauduri D., Anders M.W. 2006. Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1762: 256-265.
- Silveira J., Matos J., Cecatto V., Viegas R., Oliveira J. 2001. Nitrate reductase activity, distribution, and response to nitrate in two contrasting *Phaseolus* species inoculated with *Rhizobium* spp. *Environmental and Experimental Botany* 46: 37-46.
- Singh A., Kumar J., Kumar P. 2008. Effects of plant growth regulators and sucrose on post harvest physiology, membrane stability and vase life of cut spikes of gladiolus. *Plant Growth Regulation* 55: 221-229.
- Słowiński A. 2004. Biostymulatory w nowoczesnej uprawie roślin. *Ochrona Roślin* 2: 16–17.
- Słowiński A., Jarosz A. 2008. Włączenie biostymulatora Asahi SL do technologii uprawy rzepaku ozimego. "Biostymulatory w nowoczesnej uprawie roślin". Warszawa. 7-8.
- Sogut T. 2006. *Rhizobium* inoculation improves yield and nitrogen accumulation in soybean (*Glycine max*) cultivars better than fertiliser. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 34: 115-120.
- Stasiak G., Mazur A., Koper P., Zebracki K., Skorupska A. 2016. Symbioza rizobiów z roślinami bobowatymi (*Fabaceae*). *Postępy Mikrobiologii* 55: 289-299.
- Stawiński S. 2016. Łubin wąskolistny – gatunek niewykorzystanych możliwości. *Agro Serwis*: 25-31.
- Stitt M. 1999. Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 178-186.
- Stitt M., Hurry V. 2002. A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 199-206.
- Strzałka K. 2012. Fotosynteza i chemosynteza. [W:] Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa: 274-444.
- Swiecicki W., Szukala J., Mikulski W., Jerzak M. 2007. Możliwości zastąpienia białka śruty sojowej krajowymi surowcami. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 522: 512-515.
- Szparaga A., Kocira S., Kocira A., Czerwińska E., Świeca M., Lorencowicz E., Kornaś R., Koszel M., Oniszczyk T. 2018. Modification of growth, yield, and the nutraceutical and antioxidative potential of soybean through the use of synthetic biostimulants. *Frontiers in Plant Science* 9: 1401.
- Tester M., Langridge P. 2010. Breeding technologies to increase crop production in a

- changing world. *Science* 327: 818-822.
- Tiku A.R. 2020. Antimicrobial compounds (phytoanticipins and phytoalexins) and their role in plant defense. [W:] Mérillon J.-M., Ramawat K.G. (red.), *Co-Evolution of Secondary Metabolites*. Springer. Cham: 845-868.
- Turner N.C., Wright G.C., Siddique K.H.H. 2001. Adaptation of grain legumes (pulses) to water-limited environments. [W:] Sparks D.L. (red.), *Advances in Agronomy*, Vol 71, Vol. 71, *Advances in Agronomy*. Academic Press. Cambridge: 193-231.
- Tylman I., Kowalczyk S. 2012. Receptory i szlaki sygnałowe regulujące symbiozę brodawkową i mikoryzę arbuskularną. *Postępy Biologii Komórki* 39: 429–458.
- Urano K., Kurihara Y., Seki M., Shinozaki K. 2010. 'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 132-138.
- Vaahtera L., Brosche M. 2011. More than the sum of its parts - How to achieve a specific transcriptional response to abiotic stress. *Plant Science* 180: 421-430.
- Van Breusegem F., Bailey-Serres J., Mittler R. 2008. Unraveling the tapestry of networks involving Reactive Oxygen Species in plants. *Plant Physiology* 147: 978-984.
- Vianello A., Macri F. 1978. Inhibition of plant cell membrane transport phenomena induced by zearalenone F-2. *Planta* 143: 51-57.
- Vranova E., Inze D., Van Breusegem F. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53: 1227-1236.
- Wang D., Yang S.M., Tang F., Zhu H.Y. 2012. Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology* 14: 334-342.
- Wang H., Meng F. 1990. Formation of endogenous zearalenone and its inhibition by malathion in winter wheat during vernalization. *Acta Phytophysiological Sinica* 16: 197-200.
- Wang T.-Y., Libardo M.D.J., Angeles-Boza A.M., Pellois J.-P. 2017. Membrane oxidation in cell delivery and cell killing applications. *Acs Chemical Biology* 12: 1170-1182.
- Wang W., Xia M.X., Chen J., Yuan R., Deng F.N., Shen F.F. 2016. Gene expression characteristics and regulation mechanisms of superoxide dismutase and its physiological roles in plants under stress. *Biochemistry-Moscow* 81: 465-480.
- Weidner S. 2015. Wykorzystanie analiz proteomicznych do wyjaśnienia biologicznych podstaw tolerancji stresów u roślin. *Acta Scientiarum Polonorum: Biotechnologia* 14: 43-56.
- Wilmowicz E., Frankowski K., Glazińska P., Sidłowska M., Marciniak K., Kopcewicz J. 2011. Rola giberelin w regulacji kwitnienia roślin. *Kosmos* 60: 129-140.
- Wojtaszek P. 1997. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant

- defence response. *Acta Physiologiae Plantarum* 19: 581-589.
- Yabuta T. 1935. Biochemistry of the bakanae fungus of rice. *Agriculture and Horticulture* 10: 17-22.
- Yamagishi M., Yamamoto Y. 1994. Effect of boron on nodule development and symbiotic nitrogen fixation in soybean plants. *Soil Science and Plant Nutrition* 40: 265-274.
- Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology* 57: 781-803.
- Yang T., Poovaiah B.W. 2002. Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 4097-4102.
- Zamłyńska K., Feculak M., Suśniak K., Kidaj D., Komaniecka I., Sroka-Bartnicka A. 2020. Wpływ biopreparatów na uprawę roślin przemysłowych. *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce*: 63-68.
- Zivy M., Wienkoop S., Renaut J., Pinheiro C., Goulas E., Carpentier S. 2015. The quest for tolerant varieties: the importance of integrating "omics" techniques to phenotyping. *Frontiers in Plant Science* 6: 448.
- Zullo M.A.T., Kohout L. 2004. Semisystematic nomenclature of brassinosteroids. *Plant Growth Regulation* 42: 15-28.

Układ doswiadczeń

UKŁAD DOŚWIADCZEŃ				
Doświadczenie		Odmiana	Warianty	Badane parametry, analizy
1 Wpływ terminu siewu soi uprawnej na plonowanie	1A - 2018	„Petrina”	8 terminów + szczepionka w dwóch z nich	struktura plonu,
	1B - 2019	„Abelina” „Merlin” „Petrina”	3 terminy + agrowłóknina w jednym z nich	struktura plonu
	1C - 2020	„Abelina” „Merlin” „Petrina”	2 terminy	struktura plonu
2 Wpływ biostymulatorów na plonowanie soi uprawnej	2A - 2019	„Petrina”	metanol, krzem, Asahi SL, zearalenon	struktura plonu
	2B - 2020	„Abelina” „Merlin”	metanol, krzem, Asahi SL, zearalenon	struktura plonu, profil hormonalny
3 Wpływ zastosowanych szczepionek bakteryjnych na plonowanie soi uprawnej	3A - 2018	„Petrina”	Nitragina IUNG, Nitragina BioFood, Nitraza, izotop ¹⁵ N	parametry kinetyki fluorescencji chlorofilu <i>a</i> , zawartość białka ogólnego w liściach, aktywność reduktazy azotanowej w liściach, stosunek azotu z powietrza do azotu pobieranego z gleby, struktura plonu
	3B - 2019	„Malaga”, „Merlin”, „Petrina”	Nitragina IUNG, Nitragina BioFood, Nitroflora, <i>Rhizobium</i> Bio-Gen, HiStick® Soy, susza	parametry kinetyki fluorescencji chlorofilu <i>a</i> , aktywność reduktazy azotanowej w liściach, aktywność enzymów antyoksydacyjnych, liczba brodawek korzeniowych, struktura plonu
	3C - 2020	„Petrina”	izotop ¹³ C i ¹⁵ N, susza	dyskryminacja, stosunek poboru azotu z powietrza do azotu pobieranego z gleby
4 Ekspresja genów <i>Nod</i> pod wpływem szczepionek bakteryjnych od różnych producentów	2020	„Malaga”,	Nitragina IUNG, Nitragina BioFood, Nitroflora, <i>Rhizobium</i> Bio-Gen, HiStick® Soy	