

Dr ANNA NOWOTNY - MIECZYŃSKA

Biologiczne wiązanie azotu przez rośliny motylkowe w świetle najnowszych badań

W S T Ę P

Pytanie, czemu jedne rośliny mogą żyć bez źródła azotu w glebie, a inne w tych warunkach giną, niepokoiło umysły uczonych od dawien dawna. Jest rzeczą niezmiernie ciekawą, jak niejednokrotnie blisko byli uczeni rozwiązania tej zagadki jeszcze na długo przed klasycznymi badaniami Hellriegla, Willfahra i Prazmowskiego. Oto w r. 1850 Lachmann (4) łącząc występowanie brodawek korzeniowych roślin motylkowych z procesami pobierania pokarmów przez te rośliny stwierdził, że w brodawkach znajdują się organizmy nazwane przez niego „vibrionami”. Publikacja Lachmanna, w której omawiał swoje badania, ukazała się jednak w mało poczytnym czasopiśmie naukowym i dlatego nie zwróciła na siebie uwagi. W r. 1886 Atwater (1) znalazł, że hodowany przez niego groch pobiera z powietrza znaczne ilości azotu i wyjaśniając to zjawisko wyraził przypuszczenie, że mogło to się stać za pośrednictwem pewnych mikroorganizmów, posiadających zdolność wiązania azotu atmosferycznego. Atwater opublikował swoje badania, ale i one minęły bez echa.

Najbliżej rozwiązania tej zagadki był Boussingault (2), ale tym razem błąd popełniony został przez niezwykle skrupulatność w przeprowadzeniu doświadczenia: Boussingault chcąc pozbawić podłoże, na którym miały rosnąć rośliny motylkowe, nawet śladów azotu, wyżarzał je. Postępując w ten sposób niszczył oczywiście bakterie, a więc ten czyn-

nik, który pośredniczy w wiązaniu wolnego azotu. Na podstawie wyników tak przeprowadzanego doświadczenia autor uważał się za uprawnionego do wyprowadzenia wniosku, że rośliny „groszkowe” (jak je wtedy nazywano) pod względem żywienia azotowego niczym nie różnią się od wszystkich innych roślin „niegroszkowych”, że więc pobierają pokarm azotowy jedynie ze związków azotowych, np. saletry, a azot atmosferyczny jest dla nich niedostępnym źródłem. Boussingault był autorytetem i dlatego twierdzenie jego utrzymywało się z górą lat 40 jako niezbity pewnik naukowy.

Jednakże zarówno badania ścisłe jak i praktyka rolnicza gromadziły coraz więcej dowodów na to, że Boussingault się myli, że jednak rośliny „groszkowe” zajmują odrębne miejsce między roślinami pod względem żywienia się azotem. Na przykład Schulze z Lupitz bez dokupywania nawozów azotowych podniósł ogromnie rentowność swego gospodarstwa prowadzonego na piaskach tylko przez częste wprowadzanie do płodozmianu roślin motylkowych.

Lawes i Gilbert (5), którzy przez wiele lat śledzili na polach doświadczalnych Rothamsted zawile sprawy żywienia roślin, doszli do wniosku, że tylko i jedynie rośliny motylkowe mogą się obejść bez nawożenia azotowego. Doświadczenia ich potwierdziły również znaną od dawna prawdę, że rośliny motylkowe stanowią doskonały przedplon dla roślin zbożowych. Nasuwało się więc znowu pytanie, skąd bierze się ten azot? Wyniki doświadczeń Boussingaulta domagały się rewizji. Dokonali jej w r. 1890 Hellriegel i Willfahrt. Sprawę pobierania azotu przez rośliny motylkowe rozwiązali na podstawie doświadczeń przeprowadzonych sposobem, który w zasadzie podobny był do metody Boussingaulta z tą jedynie różnicą, że badacze ci nie wyżarzali podłoża, na którym miały rosnać ich rośliny „groszkowe”, ale oznaczyli w nim ilościowo azot przed założeniem doświadczenia, aby potem uwzględnić tę ilość przy obliczaniu końcowego bilansu azotu w roślinach doświadczalnych. Wyniki swych badań streścili w 7 następujących punktach; cytujemy je w dosłownym brzmieniu, bo choć od czasu odkrycia Heillriegla i Willfahrta minęło już 60 lat, nikt od nich jaśniej nie sprecyzował całego problemu:

- 1) rośliny motylkowe zachowują się pod względem żywienia azotowego zupełnie odmiennie niż rośliny zbożowe;
- 2) rośliny zbożowe pobierają azot jedynie z gleby i ich rozwój jest bezpośrednio zależny od zapasu azotu znajdującego się w ich środowisku odżywczym;
- 3) rośliny motylkowe posiadają jeszcze drugie źródło azotu (oprócz

azotu w glebie), z którego mogą pokrywać swoje zapotrzebowania na ten składnik;

4) tym drugim źródłem jest azot atmosferyczny;

5) rośliny motylkowe asymilują wolny azot przy współudziale pewnych mikroorganizmów żyjących w glebie;

6) specyficzne gatunki tych mikroorganizmów muszą żyć w ścisłej symbiozie z pewnym określonym gatunkiem rośliny motylkowej;

7) brodawki korzeniowe roślin motylkowych znajdują się w związku przyczynowym z całym procesem przyswajania wolnego azotu.

W ten więc sposób została wyjaśniona sprawa wzbogacania gleby w azot, a więc i sprawa korzyści, jaka wynika z uprawy roślin niemotylkowych na tym stanowisku, na którym poprzednio rosły rośliny motylkowe.

Beijerinck (3) wyeliminował te specyficzne organizmy i pierwszy otrzymał ich czyste kultury. Prazmowski (7) zaś był pierwszym, który kulturami otrzymanymi metodą Beijerincka szczepił groch i obserwował, w jaki sposób wchodzi one przez włosniki do korzeni i prześledził rozwój brodawek pod wpływem bakterii; on też pierwszy zbadał porównawczo rozwój grochu rosnącego w piasku wyjałowionym oraz w piasku również jałowym, ale zakażonym czystymi kulturami bakterii symbiotycznych.

LITERATURA

- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. <i>Atwater O.</i> : wg <i>Boden u. Pflanze</i> , E. J. Russell 16. 1936. | <i>Boden u. Pflanze</i> , E. J. Russell. 13. 1936. |
| 2. <i>Boussingault J. B.</i> : <i>Agronomie, Chimie agricole et Physiologie</i> T. 1. 1860. | 6. <i>Hellriegel H. i Willfahrt H.</i> : <i>Untersuchungen über die Stickstoffernährung der Gramineen u. Leguminosen.</i> 99. 1888. |
| 3. <i>Beijerinck M. W.</i> : <i>Bot. Zeitung</i> 46. 726. 1888. | 7. <i>Prazmowski A.</i> : <i>Brodawki korzeniowe grochu.</i> <i>Rozprawy Akad. Umiejętności w Krakowie.</i> 1890. |
| 4. <i>Lachman J.</i> : wg <i>Boden u. Pflanze</i> , E. J. Russell. 16. 1936. | |
| 5. <i>Lawes J. B. i Gilbert J. N.</i> : wg | |

I. Mechanizm wiązania azotu atmosferycznego

Po odkryciach Heillriegla, Beijerincka i Prazmowskiego zaczęli uczeni zastanawiać się, w jaki sposób system biologiczny „rośliny — bakterie” zamienia wolny molekularny azot w związki organiczne. Nad wyśledzeniem form pośrednich między azotem wolnym a związanym w związkach białkowych pracują biochemicy i mikrobiologowie całego świata

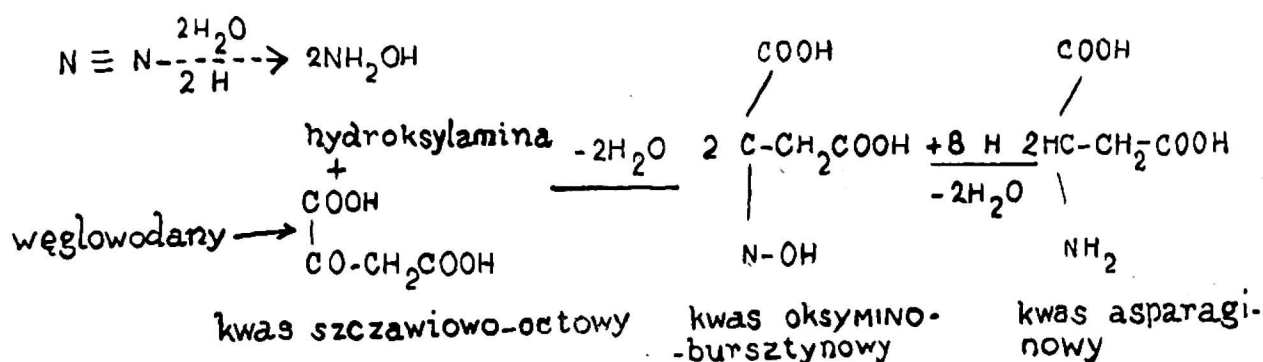
i właściwie sprawa ta nie jest wciąż jeszcze definitywnie rozwiązana. Odkrycie hemoglobiny w brodawkach korzeniowych roślin motylkowych, dokonane przez japońskiego uczonego Kubo, całą sprawę jeszcze skomplikowało. Zanim jednak przejdziemy do nowszych hipotez, mających wyjaśnić cały proces wiązania wolnego azotu, opartych na odkryciu Kubo, zrobimy krótki przegląd badań przedwojennych z tego zakresu oraz różnych hipotez osnutych na tle zaobserwowanych przez różnych badaczy zjawisk.

Są dwie teorie wiązania wolnego azotu: 1) teoria utlenienia azotu molekularnego i 2) teoria redukcji tego azotu. Produkty (utlenienia czy redukcji) dawałyby w końcowym rezultacie aminokwasy i białko z szeregiem związków pośrednich, z których jedne istnieją tylko przejściowo i dlatego trudne do zidentyfikowania, inne znów można z łatwością wykryć na drodze analitycznej.

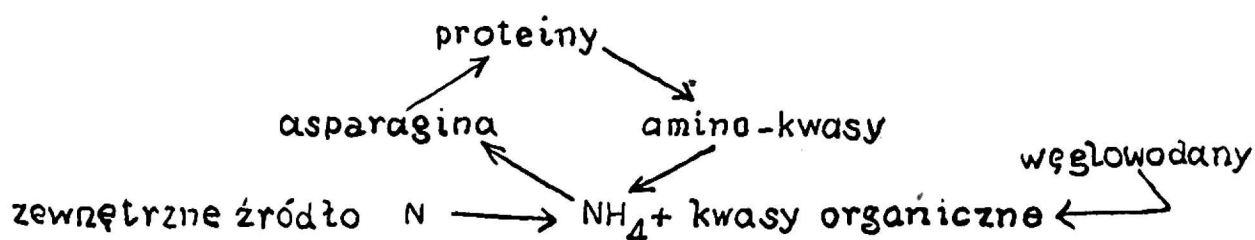
Teoria utleniania azotu posiada nielicznych zwolenników, ponieważ jedynym dowodem na to, że taką drogą mógłby postępować cały proces wiązania azotu, jest wykrycie nieznacznych ilości jonów azotanowych i azotynowych w kulturach *Azotobactera* wiążącego molekularny azot. Zwolennicy teorii *redukcyjnej* dzielą się na dwie grupy: jedną z nich reprezentuje fiński biochemik Virtanen, drugą Winogradzki. Według Virtanena (9, 10) kluczowym produktem wiązania molekularnego azotu jest *hydroksylamina*, która łącząc się z kwasem szczawiowo-octowym daje ostatecznie — kwas asparaginowy i asparaginę. Przedstawicielem teorii drugiej jest Winogradzki (7), według którego pierwszym produktem wiązania wolnego azotu jest *amoniak*.

Teoria Virtanena. Budując swoją teorię wiązania azotu oparł się Virtanen (9, 10, 11) na swoich badaniach z zakresu wydzielania produktów azotowych z brodawek korzeniowych roślin motylkowych do substratu oraz na wykryciu kwasu szczawiowo-octowego w soku roślin motylkowych. Virtanen, badając produkty wydzielone z brodawek korzeniowych roślin motylkowych do podłoża, stwierdził w nich obecność kwasu asparaginowego i asparaginy, które to związki powstawałyby, według jego przypuszczeń, na skutek kondensacji hydroksylaminy z kwasem szczawiowo-octowym. Według Virtanena w liściach grochu znajduje się 0,5 — 1 mg kwasu szczawiowo-octowego na 1 g świeżego materiału, co odpowiadałoby 0,1% w soku roślin motylkowych.* Schemat toku reakcji od wolnego azotu do aminokwasów miałby, według Virtanena, przebiegać jak następuje:

* Według badań Virtanena z 1943 r. ilości kwasu szczawiowo-octowego w soku roślin motylkowych są znacznie niższe (Virtanen A. J., Sundman J., Janes L.: *Prakt. chem.*, 162, 71, 1943).



Wilson i Wyss (5) atakują teorię Virtanena opartą głównie na badaniach wydzielin brodawek korzeniowych roślin motylkowych. Wilson stawia pytanie, czy obecność asparaginy w wydzielinach brodawkowych jest wystarczającym dowodem na to, że pierwszym produktem wiązania wolnego azotu jest hydroksylamina? Według Wilsona i Wyssa (5), kwas asparaginy i asparagina są najważniejszymi produktami w metabolizmie roślin zarówno motylkowych jak i niemotylkowych bez względu na pochodzenie azotu; dlatego przypuszcza Wilson, że asparagina może znajdować się w brodawkach korzeniowych i w produktach ich wydzielin jako produkt wtórny związanego symbiotycznie azotu, a nie jako związek końcowy i bezpośredni przyswajania wolnego azotu. Na poparcie swoich poglądów przytacza Wilson (6) wyniki badań Schulze-go, z których widać, że roślina (motylkowa i niemotylkowa) karmiona nieorganicznymi związkami azotu przekształca je w związki amonowe, które dość szybko przeobrażają się z kolei w kwas asparaginy i asparaginę. Na skutek syntezy z kwasami organicznymi przez kondensację asparaginy tworzą się białka. Schulze przedstawia tę sprawę w następującym schemacie:



Schulze twierdzi, że asparagina jest jedynym aminokwasem tworzącym białka roślinne, inne aminokwasy występujące w roślinach stanowią według niego tylko produkty rozkładu ciał białkowych. Odnosi się to zarówno do metabolizmu roślin motylkowych jak i niemotylkowych.

Jak powyżej już zaznaczyliśmy, kwas szczawiowo-octowy odgrywa według hipotezy Virtanena ważną rolę w procesie wiązania azotu. Na dowód, że hipoteza Virtanena może być słuszna, Wyss (8) przytacza na-

stępujące własne doświadczenie: rozgniecione brodawki korzeniowe grochu przechowywano w temp. 37° C w ciągu 40 minut i znaleziono, że w tych warunkach

brodawki same produkują — 5,70 mg kwasu asparaginowego;

brodawki plus kwas szczawiowo-octowy — 9,12 mg kwasu asparaginowego;

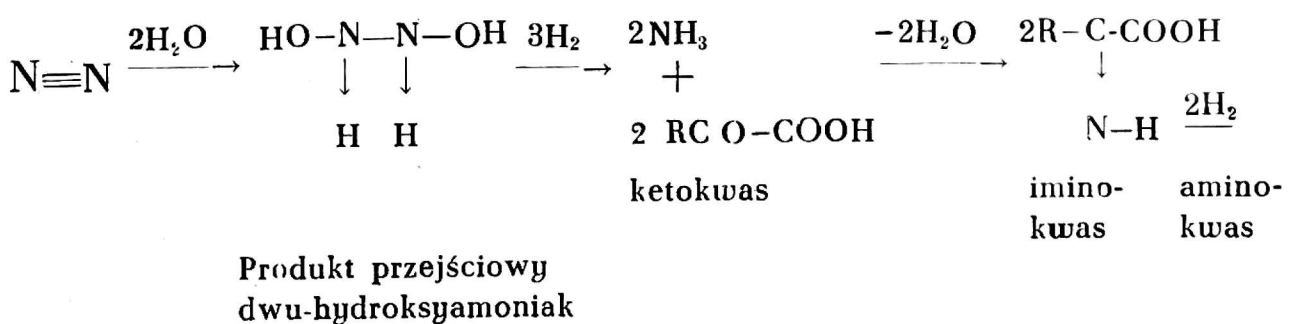
brodawki plus kwas szczawiowo-octowy plus alanina — 10,35 mg kwasu asparaginowego.

Virtanen (10) doświadczenie to jeszcze modyfikuje w ten sposób, że *odcięte* od korzeni brodawki zasila kwasem szczawiowo-octowym i stwierdza w 25 doświadczeniach w ten sposób przeprowadzonych przyswajanie wolnego azotu. Uczony ten twierdzi, że obecność kwasu szczawiowo-octowego w brodawkach korzeniowych roślin motylkowych jest kardynalnym warunkiem związania hydroksylaminy (kluczowego produktu przyswajania wolnego azotu) na kwas asparaginowy, z którego następnie powstaje białko.

Na poparcie swojej koncepcji Virtanen przytacza jeszcze inne doświadczenie, które przeprowadził w następujący sposób: rośliny motylkowe trzymane przez 24 godziny w roztworze 2 — 4% KNO₃ wykazywały obecność hydroksylaminy, która według przypuszczeń Virtanena utworzyła się drogą redukcji azotanów. Hydroksylamina w obecności kwasu szczawiowo-octowego lub kwasu alpha-ketoglutazarowego daje w rezultacie odpowiedni oksym (jako związek przejściowy), a jako końcowy — kwas asparaginowy.

Pomimo argumentów Virtanena hipoteza *amoniakalna* Winogradzkiego (7) znajduje licznych zwolenników.

Teoria ta oparta jest na tej zasadzie, że wodór uzyskany z procesów dehydrogenacji redukuje molekularny azot do amoniaku, który łącząc się z ketokwasami daje jako produkt przejściowy iminokwas, a jako końcowy kwas glutaminowy (a nie was asparaginowy jak w teorii Virtanena). Schemat teoretyczny hipotezy Winogradzkiego przedstawia się jak następuje:



Teorię swoją oparł Winogradzki (7) na obserwacjach uzyskanych podczas następujących badań: odcięte od korzeni brodawki grochu przechowywał autor w termostacie w temp. 40°C i znalazł, że umieszczony obok brodawek czerwony papierek lakmusowy zmieniał barwę na niebieską, a znajdujący się w sąsiedztwie kwas siarkowy zawierał znaczne ilości amoniaku. Stosowanie środków antyseptycznych nie powstrzymywało wydzielania się amoniaku. Korzenie grochu bez brodawek, znajdujące się w takich samych warunkach, tego połączenia nie produkowały.

Podobne doświadczenie przeprowadził Kraszennikow (3) stosując do pomiaru azotu ścisłą gazometryczną metodę: brodawki z korzeniami lub bez umieszczał w naczyniu nad rtęcią w atmosferze mieszaniny gazów o znanym składzie. Autor stwierdził, że ilości przyswojonego w takich warunkach azotu przez brodawki znajdowały się tylko w granicach błędu doświadczalnego. Beijerinck (1) badając odcięte od korzeni brodawki grochu, łubinu i seradeli również nie stwierdził przyswajania azotu. Wilson, Hopkins i Fred (4) także nie znaleźli wiązania azotu przez odcięte brodawki i na tej podstawie twierdzą, że całe rozumowanie Winogradzkiego oparte jest na błędnym założeniu; być może, przypuszcza Wilson (6), amoniak w doświadczeniu Winogradzkiego pochodził tylko z rozkładu związków organicznych brodawek grochu.

W ostatnich latach zastosowano do badań nad asymilacją wolnego azotu precyzyjną metodą izotopów. Do doświadczeń tych użyto *Azotobacteria vinelandia*, a wyniki tych doświadczeń uważane są za ważki dowód słuszności hipotezy Winogradzkiego.

Doświadczenie przeprowadzono (Burris, Wilson — 2) w następujący sposób:

kulturę *Azotobacteria*, która przez 18 godzin rosła w atmosferze o normalnym składzie, zasilono na przeciąg 90 minut molekularnym azotem wzbogacanym izotopem azotu N^{15} ; po upływie tego czasu poddano komórki *Azotobacteria* hydrolizie i znaleziono w jej produktach kwas glutaminowy, zawierający przeważną część dodanego izotopu N^{15} , reszta N^{15} znajdowała się pod postacią kwasu asparaginowego.

Burris (2) przeprowadził inne jeszcze doświadczenie, którego wynik również przemawia za słusznością hipotezy amoniakalnej: kulturę *Azotobacter vinelandii*, który w ciągu 18 godzin rozwijał się w atmosferze molekularnego azotu, zasilono pod koniec tego czasu amoniakiem wzbogacanym izotopem N^{15} . Po upływie jednej minuty stwierdzono w komórkach *Azotobacteria* obecność N^{15} pod postacią amoniaku. Jeżeli jednak zamiast amoniaku dodano do kultury *Azotobacteria* równoważną

ilość N w postaci azotanów zawierających izotop N^{15} , to znaleziono w komórkach *Azotobacteria* dodany N^{15} dopiero po upływie 30 minut. Byłoby to dowodem, według autora, że azotany wymagają pewnego czasu do zmiany swojego azotu na taką formę, która by mogła być użyta do syntezy aminokwasów. Prawdopodobnie, twierdzi autor, odgrywa tu rolę system enzymatyczny, który pośredniczy w przemianie azotanów w formę aminokwasów najodpowiedniejszą do produkcji białka.

Nie znajdujemy jeszcze w literaturze badań nad wiązaniem wolnego azotu metodą wzbogacenia hydroksylaminy izotopem N^{15} . Badania takie niewątpliwie przyczyniłyby się do rozstrzygnięcia sporu między zwolennikami teorii hydroksylaminowej Virtanena i amoniakalnej Winogradzkiego. Niektórzy uczeni są jednak zdania, że teorie te nie wykluczają się wzajemnie z tym zastrzeżeniem, że w systemie amoniakalnym końcowym produktem wiązania azotu byłby kwas glutaminowy, przy systemie hydroksylaminowym kwas asparaginowy.

Zupełnie odrębne stanowisko w sprawie całego zagadnienia wiązania wolnego azotu przez system roślinny — bakterie zajął Prianisznikow w swej fundamentalnej pracy pt. „Azot w życiu roślin i w rolnictwie ZSRR” (Moskwa, wydawnictwo Akademii Nauk ZSRR, 1945).

Omawiając w swym dziele różne teorie wiązania atmosferycznego azotu uczony ten w końcu dochodzi do wniosku, że wyśledzenie fazy przejściowej od wolnego azotu do aminokwasów (amoniak czy hydroksylamina) jest według niego sprawą mniejszej wagi. Sprawą najbardziej interesującą byłoby „podpatrzenie przyrody”, w jaki sposób pod względem katalitycznym odbywa się w niej proces związania atmosferycznego azotu z wodorem, który to proces, jak wiadomo, zachodzi w warunkach normalnej temperatury i normalnego ciśnienia. Poznanie tego mechanizmu byłoby według Prianisznikowa wskazówką dla techniki, która dotychczas w takich warunkach wolnego azotu wiązać nie umie.

Przypomnijmy jeszcze raz dowody Virtanena użyte na poparcie jego teorii hydroksylaminowej oraz argumenty Wilsona i współpracowników, którzy tę teorię negują, przy czym nie przeciwstawiają żadnej własnej teorii.

1) Kwas asparaginowy jest jedynym połączeniem aminowym, które znaleziono w produktach wydzielania z brodawek korzeniowych roślin motylkowych do ich środowiska odżywczego.

2) W wydzielinach tych stwierdzono obecność małych ilości oksymów określonych przez Virtanena (10) jako kwas oksyminobursztynowy.

3. Kwas szczawiowo-octowy znajduje się w soku roślin motylkowych.

4. Odcięte od korzeni brodawki roślin motylkowych przyswajają w obecności kwasu szczawiowo-octowego więcej azotu niż w nieobecności tego związku.

Szkoła amerykańska z Wilsonem (6) na czele kwestionując szereg punktów badań Virtanena przytacza następujące kontrargumenty:

1) Virtanen znalazł w roślinach motylkowych znacznie większe ilości kwasu szczawiowo-octowego, w warunkach badań przeprowadzonych w Ameryce nie znaleziono w ogóle tej substancji w soku roślin motylkowych.

2) Wydzielanie azotu z brodawek korzeniowych roślin motylkowych do podłoża jest, według nich, raczej wyjątkiem niż regułą, a więc budowanie teorii na obecności kwasu asparaginowego w wydzielinach z brodawek należy uważać za sprawę problematyczną.

3) Wilson i współpracownicy przebadali w ostatnich latach więcej niż 100 próbek wyciętych brodawek i tylko w znikomej ilości doświadczeń znaleźli przyswajanie przez nie wolnego azotu, bez względu na to czy zasilano brodawki kwasem ketoglutarynowym, czy szczawiowo-octowym, czy też nie dodawano żadnego z tych związków.

Powojenne badania Virtanena zmusiły go również do zakwestionowania wyłączności teorii hydroksylaminowej: Virtanen badając w r. 1946 (11) wydzieliny korzeniowe roślin motylkowych znalazł w nich nie tylko kwas asparaginowy, ale i kwas glutaminowy obok beta-alaniny i kwasu oksymino-bursztynowego. Virtanen przyjmuje obecnie stanowisko kompromisowe w kwestii kluczowego produktu wiązania molekularnego azotu; formą przejściową przy syntezie aminokwasów z wolnego azotu może być według niego zarówno hydroksylamina jak i amoniak.

Z tego krótkiego przeglądu badań widzimy, że w procesie wiązania wolnego azotu nie wyświetlono dotychczas należycie jakości przejściowych produktów między molekularnym azotem a ciałami białkowymi.

LITERATURA

1. *Beijerinck M. W.*: The significance of the tubercule bacteria of the Papilionaceae for the host plant. *Verzamelde Geschriften* (1922) 5. 264 lub wg *The biochemistry of Nitrogen fixation*, P. W. Wilson. 112. 1940.
2. *Burris R. H., Wilson P. W.*: Annual Review of Biochemistry. Vol. XIV. 698. 1945.
3. *Krasznennikow T.*: wg *The Biochemistry of Nitrogen Fixation* P.W. Wilson. 110. University of Wisconsin Press. 1940.

4. *Wilson P. W. a Hopkins E. W. and Fred E. B.*: Archiv f. Microbiologie. 322. 1932/3.
5. *Wilson P. W. i Wyss O.*: wg Wilson P. W. The Biochemistry of Symbiotic Nitrogen Fixation 164. Univer. of Wisconsin Press. 1940.
6. *Wilson P. W.*: The Biochemistry of Symbiotic Nitrogen Fixation 170. Univer. of Wisconsin Press. 1940.
7. *Winogradzki S. i Winogradzka H.*: Com. Ren. 213, 713, (1941) i wg: Burris R. H. i Wilson P. W. Annual Revn. of Biochemistry T. XIV. 698. 1945.
8. *Wyss O.*: wg Wilson P. W. The Biochemistry of Symbiotic Nitrogen Fixation 175. Univer. of Wisconsin Press. 1940.
9. *Virtanen A. J.*: Cattle Fodder and Human Nutrition (1938), Cambridge University Press, London lub wg: Burris R. H. i Wilson P. W., Annual Review of Biochemistry. XIV. 697. 1945.
10. *Virtanen A. I.*: Mechanizm of Symbiotic Nitrogen Fixation by leguminous plants. Third Comm. Intern. Soc. Soil. Trans. A. 4 — 19. 1939.
11. *Virtanen A. I., Linkola N., Haccala M. A. Rautanen N.* Glutamic acid among the excretion products of leguminous root nodules. Suomen Kemistilehti 19. B. 83. 1946 lub wg: P. W. Wilson i R. N. Burris. Bacteriological Reviews Vol. 11. N 1. 1947.

II. Pigmentacja brodawek korzeniowych roślin motylkowych

W roku 1908 Palladin (6) badając strukturę brodawek korzeniowych roślin motylkowych zauważył, że treść brodawek ma czerwone zabarwienie. Gugenheim (2) wyizolował ten barwik z wyki i określił go jako kwas dwuoksyfenylo-alfa-aminopropionowy. Friedheim (1) uważa czerwony barwik brodawek za produkt działania tyrozynazy, ulegający pod wpływem wodoru redukcji do *leukociała*. Reakcja ta według niego jest odwracalna.

W r. 1938 Pietz (7) ogłasza swoje badania nad barwikiem brodawek korzeniowych stwierdzając, że barwik ten znajduje się tylko w zdrowych brodawkach i że obecność jego jest jednym z istotnych warunków symbiotycznego przyswajania azotu. Według tego autora połączenie to jest związkiem pośrednim przy przemianie tyrozyny lub dwuoksyfenyloalaniny w związek melaninowy. Sok wyciśnięty z brodawek korzeniowych i poddany wysokiej temperaturze staje się czarny. Pod wpływem czynników redukcyjnych czerwone zabarwienie „soku” już nie powraca. Jeżeli świeże brodawki korzeniowe poddamy działaniu czynników re-

dukcyjnych, ich czerwone zabarwienie znika, powraca jednak pod wpływem czynników utleniających. Tak więc, według Pietza, czerwony pigment znajduje się w czynnych brodawkach korzeniowych w stanie utlenionym.

W roku 1939 Kubo (5) ekstrahował roztworem siarczanu amonowego pigment brodawek korzeniowych soi i poddał go badaniom spektroskopowym. Otrzymał widmo absorbcyjne dwusmugowe. Maksyma absorbcji tych smug znajdują się przy długości fal 575 m μ . Działając na wyodrębniony produkt czynnikami redukcyjnymi otrzymał jednosmugowe widmo z maksimum absorbcji przy długości fal 550 m μ . Substancja wyodrębniona soi daje kryształki heminy, niczym nie różniące się od protoheminy krwi zwierząt kręgowych. Na tej podstawie Kubo określił czerwony pigment brodawek soi jako *hemoproteinę* podobną do hemoglobiny, a działającą w brodawkach — jako nosiciel i przekaźnik tlenu.

Badania Kubo podjął Virtanen (8) i w pierwszych powojennych latach rozpracował całe zagadnienie na wielką skalę. Przede wszystkim stwierdził, że nie tylko brodawki soi, ale i grochu zawierają czerwony pigment podobny do hemoglobiny. Virtanen rozróżnia dwa rodzaje brodawek na korzeniach roślin motylkowych: białe i czerwone. Brodawki białe otrzymał wtedy, gdy szczepił groch kulturami bakterii *Rhizobium*, słabo aktywnymi lub nieaktywnymi; natomiast brodawki były zabarwione na czerwono zawsze wtedy, gdy roślinę motylkową zaszczepił czynnym szczepem *Rhizobium*. Virtanen nazwał czerwony pigment roślin motylkowych „leghemoglobina”. W preparacie otrzymanym z rozgniecionych brodawek korzeniowych soi przez ekstrakcję roztworem siarczanu amonowego oznaczał Virtanen ilość żelaza. Stwierdził, że preparat przez niego otrzymany zawiera ten sam procent żelaza, co i hemoglobina krwi zwierząt kręgowych. Według Virtanena leghemoglobina różni się od hemoglobiny krwi zwierząt kręgowych większą łatwością samoutlenienia się do methemoglobiny. Podczas, gdy zdrowa krew zwierząt kręgowych zawiera tylko znikome ślady methemoglobiny, brodawki korzeniowe zawierają, według niego, nieraz wysoki procent tego połączenia. Virtanen przypuszcza, że dzieje się to częściowo za sprawą oksydaz znajdujących się w czynnych brodawkach korzeniowych roślin motylkowych, częściowo zaś dzięki specyficznej właściwości leghemoglobiny do samoutlenienia. Na tej podstawie Virtanen sądzi, że składnik proteinowy w czerwonym pigmentcie brodawek jest w inny sposób złączony z grupą prostetyczną niż w hemoglobinie krwi zwierząt kręgowych.

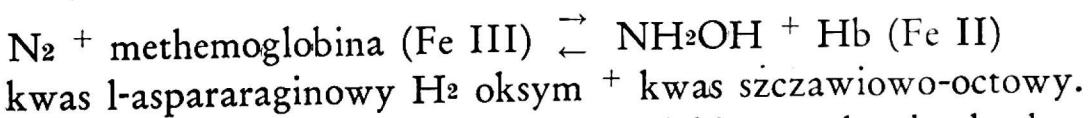
Według Virtanena, leghemoglobina znajduje się tylko w czynnej tkan-

ce bakterioidalnej brodawek korzeniowych, natomiast nie ma jej w jałowych komórkach brodawek korzeniowych.

W okresie przekwitania i dojrzewania rośliny motylkowej zjawia się w czynnych brodawkach korzeniowych pigment zielony. Według Virtanena pigment ten jest mieszaniną chromoproteidów (białka złożone, cechujące się obecnością jakiegoś barwika jako grupy prostetycznej) rozpuszczalnych w wodzie, o zawartości 0,28% Fe. Virtanen twierdzi, że przy tworzeniu się tego barwika w brodawkach decydującą rolę odgrywa kwas askorbinowy. Doświadczenia tego badacza przeprowadzone *in vitro* wykazały, że hemoglobina i methemoglobina brodawek gwałtownie zmieniają kolor czerwony na zielony w temperaturze pokojowej, jeżeli roztwór zawiera kwas askorbinowy i nadtlenek wodoru. Być może, przypuszcza Virtanen, w okresie dojrzewania roślin motylkowych znika z brodawek korzeniowych substancja, która przedtem zapobiegała przemianie barwika czerwonego w zielony; substancją tą mógłby być kwas szczawiowo-octowy lub jakiś inny, czynny w brodawkach, związek. Tak więc natura zielonego barwika i jego rola w brodawkach korzeniowych jest jeszcze wciąż niewyjaśniona.

Jaką jednak rolę odgrywa w brodawkach korzeniowych roślin motylkowych czerwony barwik brodawek? Virtanen uważa, że różnica między hemoglobina a leghemoglobina (pigment brodawek) polega na większej łatwości leghemoglobiny do samoutlenienia się, a więc przemiany w methemoglobinę. Dobre funkcjonowanie całego aparatu przyswajania wolnego azotu uzależnione byłoby od zmiany wartościowości żelaza hemoglobiny. Według Virtanena proces asymilacji azotu związany jest z właściwością leghemoglobiny do magazynowania i przenoszenia tlenu atmosferycznego. Dlatego też, tłumaczy Virtanen, w warunkach beztlenowych nawet bardzo aktywne szczepy *Rhizobium* nie spełniają swej roli wiązania azotu, a brodawkom korzeniowym brak jest wtedy czerwonego pigmentu.

Virtanen na podstawie powyższych danych wysuwa nową hipotezę wiązania wolnego azotu: tlen niesiony przez legmethemoglobinę utlenia molekularny azot przyswojony przez *Rhizobium* dając w ten sposób pierwszy produkt wiązania azotu. Teorię tę wyraża następujące równanie:

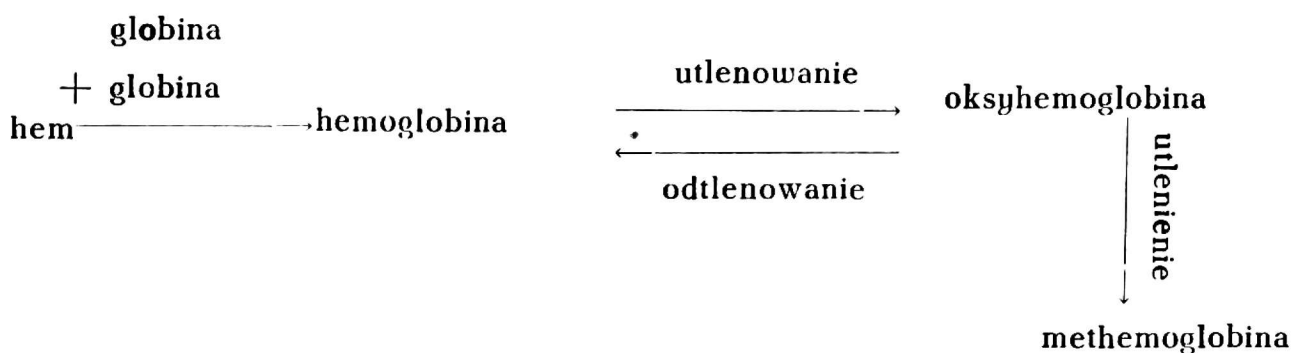


Według Virtanena działalność hemoglobiny w brodawkach polegała by na: 1) ułatwieniu czynności oddechowych bakterii; 2) utlenianiu azo-

tu molekularnego przy równoczesnej zmianie ładunku elektrycznego żelaza hemoglobiny. Tak więc cały proces wiązania azotu polegałby na cyklicznej zmianie wartościowości żelaza zawartego w czerwonym pigmentie brodawek korzeniowych.

Badania Keilina (3) wykazały jednak, że rozumowanie Virtanena oparte jest na błędnym założeniu. Czerwony barwik brodawek roślin motylkowych, hodowanych bądź to w warunkach normalnego oświetlenia, bądź też w cieniu, nie zawiera zupełnie methemoglobiny. Virtanen znalazł to połączenie, twierdzi Keilin, ponieważ badał barwik wyodrębniony z brodawek drogą ekstrakcji, w czasie której hemoglobina została utleniona pod wpływem chinonów utworzonych podczas tejże ekstrakcji. Według Keilina, czynne brodawki korzeniowe wykazują tylko obecność mieszaniny hemoglobiny i oksyhemoglobiny. Badacz ten stwierdził, że czerwony pigment wyciśnięty z brodawek korzeniowych soi posiada naturę hematynową. W przeciwieństwie jednak do poglądów Kubo i Virtanena, Keilin dowodzi, że barwik ten jest nie tylko związkami „podobnym” do hemoglobiny, ale prawdziwą hemoglobina, identyczną z hemoglobina krwi zwierząt kręgowych. Badania swoje przeprowadzał Keilin na pigmentie wyciśniętym z brodawek korzeniowych soi i oczyszczonym przez frakcjonowanie strącanie roztworem siarczanu amonowego. Autor badał widmo absorbcyjne w mikrospektroskopie i znalazł, że barwik ten w zetknięciu z tlenem nie ulega utlenieniu, lecz „utlenowaniu”, tzn., że wchodzi z nim w luźny związek chemiczny zwany oksyhemoglobina. Widmo tego połączenia cechuje się dwoma smugami absorbcyjnymi w zielonej części widma o maksimum absorbcji przy długości fal—576 m μ i 547 m μ . Tego rodzaju widmo, charakterystyczne dla oksyhemoglobiny (HbO₂) znika, jeżeli na roztwór tego barwika podziałamy hydrosiarczynem sodowym. Powstaje wówczas jedna smuga absorbcyjna z maksimum absorbcji przy długości fal 557 m μ . Smuga ta należy do hemoglobiny (Hb). Tak więc, zadając roztwór oksyhemoglobiny czynnikami redukcyjnymi i kolejno wytrząsając „odtlenowaną” hemoglobina z powietrzem atmosferycznym, można dowolnie zmieniać charakter widma badanego roztworu hemoglobiny. Zarówno hemoglobina krwi zwierząt kręgowych jak i hemoglobina brodawek korzeniowych tworzy z tlenem molekularnym luźne i doskonałe odwracalne połączenie, którego żelazo znajduje się w stanie dwuwartościowym. Połączenie to pod wpływem silnych czynników utleniających zmienia barwę z czerwonej w żółto-brunatną i równocześnie zachodzą charakterystyczne zmiany w widmie absorbcyjnym. Otrzymujemy związek zwany methemoglobina, której cechą charakterystyczną jest obecność żelaza trójwartościowego i niemożność

ulegania odwracalnemu „utlenowaniu”. Reakcje powyższe przebiegają według następującego schematu:



Hemoglobina wyodrębniona z brodawek korzeniowych soi daje z tlenkiem węgla charakterystyczne połączenie, które podobnie jak oksyhemoglobina, jest połączeniem nietrwałym i w atmosferze wolnej od CO rozpada się z powrotem na tlenek węgla i na hemoglobinę. Keilin stwierdził, że asymilacja wolnego azotu bywa natychmiast zahamowana, jeżeli rośliny motylkowe znajdują się w atmosferze o niskim ciśnieniu parcjalnym* tlenku węgla. Zjawisko to jest podobne do zjawiska zachodzącego w ustroju zwierzęcym pod wpływem tlenku węgla: jak wiadomo tlenko-węglowa hemoglobina krwi zwierząt kręgowych traci zdolność odwracalnego łączenia się z tlenem i tlenek węgla blokuje rozprowadzenie tlenu po ustroju zwierzęcym przez hemoglobinę (np. przy zatruciu czadem).

Keilin (4) i jego współpracownicy badali całkowitą zawartość hematyny w brodawkach roślin hodowanych w silnym świetle lub też roślin nieco zaciemnionych i stwierdzili, że nie ma methemoglobiny ani w brodawkach roślin oświetlonych, ani zaciemnionych, natomiast znaleźli, że w brodawkach roślin zaciemnionych przez 12 dni całkowita ilość hemoglobiny (określonej jako hemochromogen pirydyny) była znacznie niższa niż w brodawkach roślin niezaciemnionych. Stężenie hemoglobiny w komórkach brodawek czynnych oznaczono w ekstrakcie brodawek. Stężenie to wynosi, według Keilina, około $1,1 \times 10^{-4}$ gm mol. hematyny na litr, natomiast wartość znaleziona bezpośrednio w skrawkach brodawek wynosi: $2,3 \times 10^{-4}$ gm mol. hematyny.

Jak wiadomo, w świecie roślinnym znajdujemy szereg enzymów, które w swojej strukturze zawierają układ hemu. Enzymem tego typu jest *katalaza*, dalej *peroksydazy* nadające wodzie utlenionej zdolność utleniania różnych ciał nie ulegających utlenieniu przez H_2O_2 w nieobecności enzymu i wreszcie trzeci enzym — *oksydaza cytochromowa* znana pod nazwą „fermentu oddechowego”.

Jednakże hemoglobina w brodawkach korzeniowych roślin motylko-

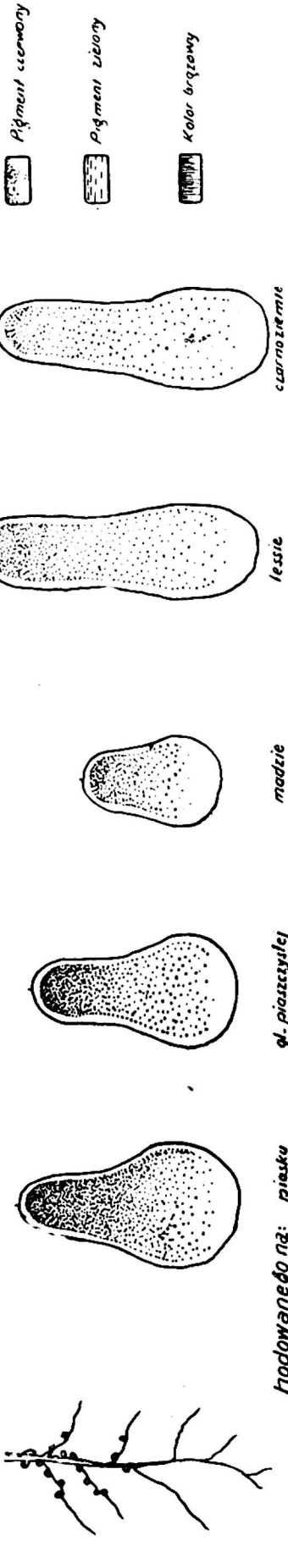
* Ciśnieniem częściowym, czyli parcjalnym, nazywamy prężność wywieraną przez dany gaz występujący w mieszaninie z innymi gazami, wyrażoną w mm słupa rtęci.

wych stanowi dotychczas jedyny znany wypadek występowania w roślinach „prawdziwej” hemoglobiny, identycznej z hemoglobina krwi zwierząt kręgowych. Fakt, że: 1) *barwik ten tworzy się w roślinach tylko przy zaszczepieniu ich aktywnym szczepem bakterii Rhizobium*, 2) *że jest on zlokalizowany tylko wewnątrz komórek zawierających organizmy symbiotyczne i* 3) *że proces asymilacji wolnego azotu jest natychmiast zahamowany w obecności tlenku węgla*, dowodzi, że *obecność hemoglobiny w brodawkach korzeniowych roślin motylkowych jest ściśle związana z całym zjawiskiem przyswajania molekularnego azotu przez te bakterie*. Badania puławskie,* prowadzone w ubiegłym sezonie wegetacyjnym nad pigmentacją grochu, łubinu (rys. 1 i 2) i seradeli wykazały, że rozwój brodawek korzeniowych tych roślin zachodzi bez względu, na jakim typie podłoża glebowego te rośliny rosły, według następującego schematu: w młodej brodawce np. grochu widzimy (rys. 1) lekko różowe zabarwienie, w miarę powiększania się brodawek barwa ta stopniowo staje się mocniejsza. Pigment wypełnia brodawki mniej więcej do jej połowy, z najsilniejszym natężeniem barwy u nasady brodawki. W okresie poprzedzającym kwitnienie różowe zabarwienie brodawek zmienia się w krwisto-czerwone i pigment zajmuje już około $\frac{3}{4}$ pojemności brodawki.

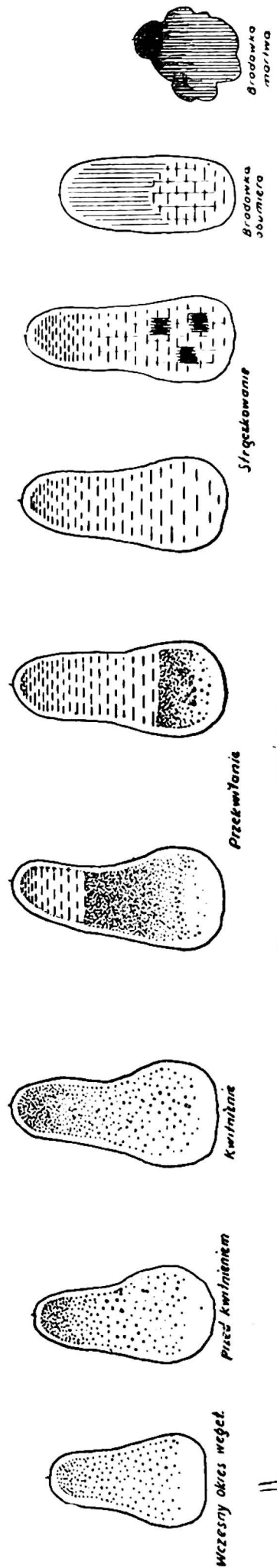
Mniej więcej w 6 tygodniu rozwoju rośliny, czyli w okresie kwitnienia, nasilenie barwy czerwonej osiąga swe maksimum, a równocześnie przyswajanie azotu jest najsilniejsze. Kwitnienie roślin jest punktem zwrotnym w rozwoju jej brodawek, w tym czasie bowiem pojawia się w brodawce pigment inny, zielony. Barwik ten nie mieszając się z pigmentem czerwonym, powoli, stopniowo ruguje go z górnej części (jej nasady) brodawki na jej dno (rys. 1). Niebawem barwik zielony zajmuje już całą objętość brodawki, z najsilniejszym natężeniem w jej miejscu najwęższym. Jest to okres, w którym zaczyna się starzenie brodawek, pokrywają się one coraz liczniejszymi plamami barwy brązowej, po czym kurczą się, tracą miąższość i w końcu odpadają od korzenia. Jeżeli jednak podłoże, w którym rosną rośliny motylkowe, zasobne jest w składniki pokarmowe i rośliny rozwijają się nadal, to mogą powstać jak np. w wypadku u grochu coraz nowe brodawki, teraz już nie na korzeniu palowym, jak to obserwowaliśmy we wczesnym okresie wegetacji rośliny, ale przeważnie na korzeniach przybyszowych rośliny, na ich najmłodszych odgałęzieniach. Są to już nie pojedyncze brodawki, ale mniejsze i większe ich skupienia o zabarwieniu zielono-różowym, potem tylko zielonym, w końcu brązowym, aż wreszcie i te brodawki martwie-

* Badaniom tym będzie poświęcona osobna publikacja.

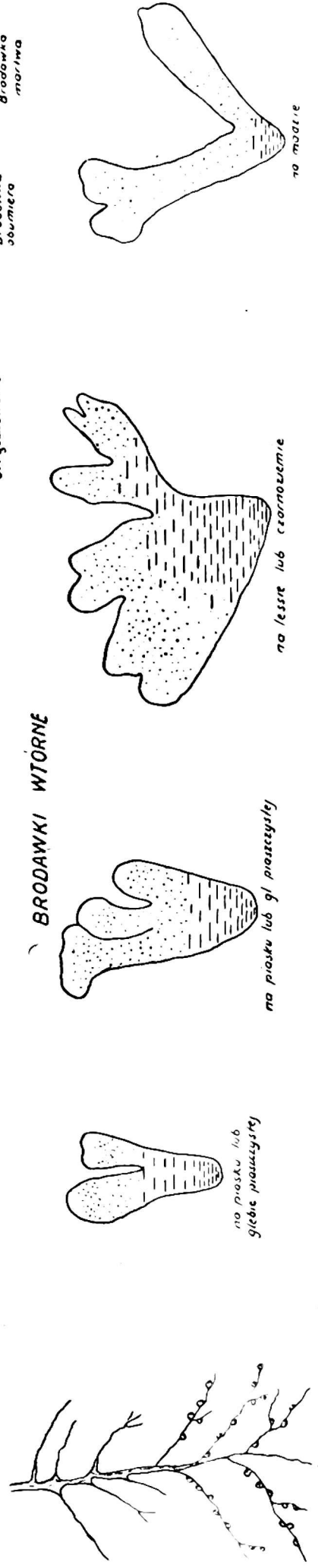
BRODAWKI KORZENIOWE GROCHU



W RÓŻNYCH STADIACH ROZWOJU ROŚLINY



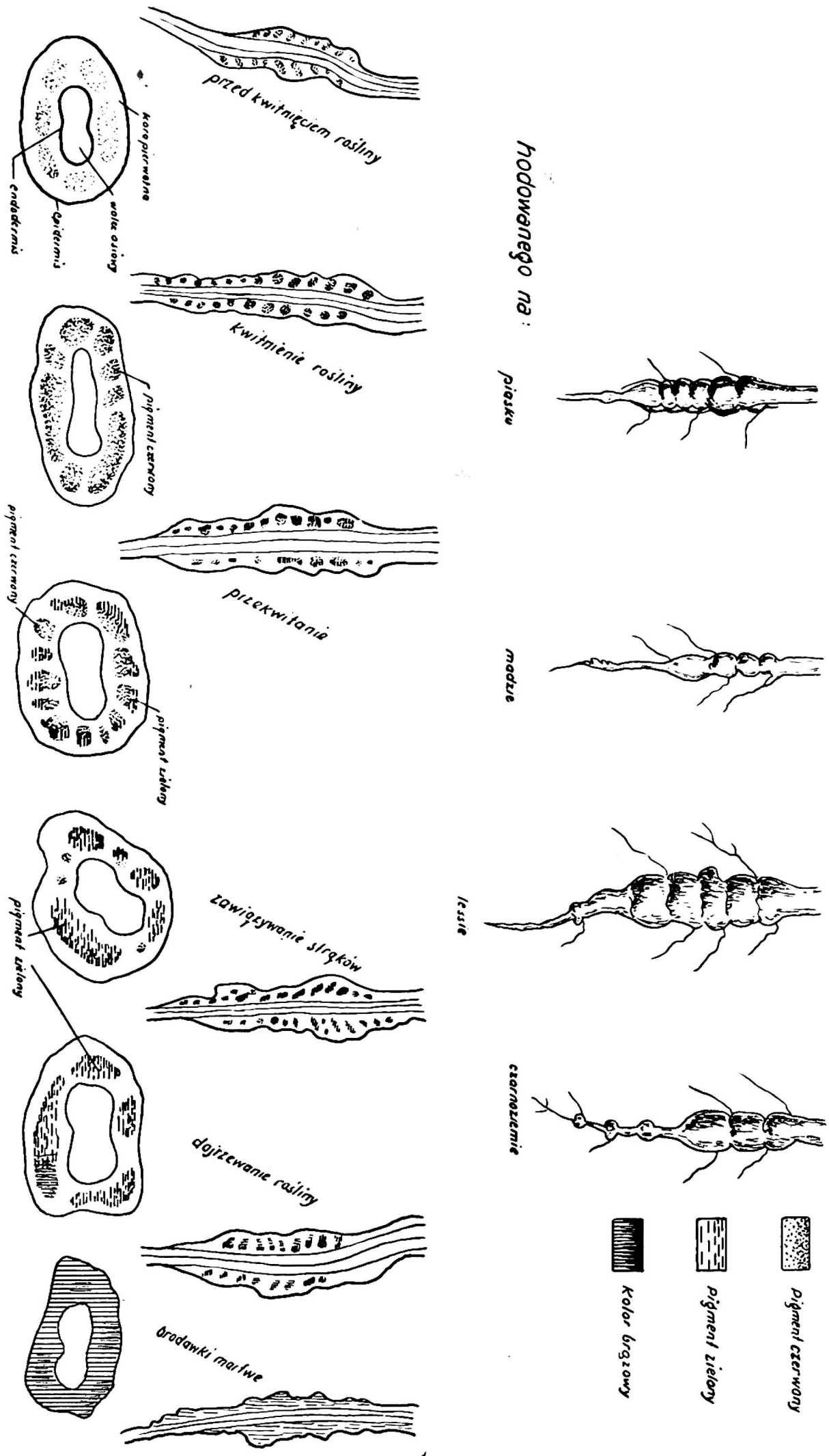
BRODAWKI WTORNE



Brodawkopanie włóse na korzeniach przybytnowych

Rys. 1

BRODAWKI KORZENIOWE ŻÓLTEGO (SŁODKIEGO) LUBINU



Rys. 2.

ją, pustoszeją i odpadają od korzenia. Brodawki te nazwaliśmy brodawkami „wtórnymi” (rys. 1).

Fazy rozwojowe brodawek korzeniowych łubinu są w zasadzie podobne do tych, które obserwowaliśmy na brodawkach grochu (rys. 2). Czerwony pigment brodawek łubinu jest w pierwszym stadium rozwoju rośliny jasno-różowy, w miarę jej wzrostu staje się coraz to bardziej intensywny i w okresie kwitnienia rośliny jest krwisto-czerwony. Gdy łubin przekwita, pojawia się w brodawce pigment zielony postępujący od kory pierwotnej korzenia do środka brodawki w kierunku walca osiowego korzenia i znów, nie mieszając się z pigmentem czerwonym brodawki, stopniowo posuwa się naprzód zajmując w okresie zawiązywania strąków przez roślinę całą pojemność gniazd tkanki bakteroidalnej brodawki. Wkrótce potem ten pigment zmienia barwę na brązową, cała brodawka ciemnieje, kurczy się i w końcu ulega rozkładowi.

Stadia rozwojowe brodawki seradeli są takie same jak w brodawce grochu, z tą tylko różnicą, że brodawki korzeniowe seradeli posiadają znacznie mniej tego pigmentu niż brodawki grochu; zabarwienie brodawek seradeli nawet w okresie kwitnienia roślin jest tylko różowe.

Brodawkowanie grochu i łubinu, hodowanych w warunkach doświadczenia wazonowego w Instytucie Puławskim na kilku typach gleb, wykazały, że najwięcej hemoglobiny wyprodukowały brodawki korzeniowe (grochu i łubinu) hodowane na czystym bezazotowym piasku, najmniej zaś było jej w brodawkach tych roślin, które rosły na madzie. Najwcześniejsze zawiązywanie brodawek znaleziono na roślinach hodowanych na piasku, najpóźniejsze na madzie. Byłoby to dowodem, że różne podłoża glebowe działają swoiście na tempo rozwoju brodawek korzeniowych roślin motylkowych i na ilość wytwarzanej w nich hemoglobiny.

Równoległe z obserwacjami nad zmianami pigmentacji w brodawkach korzeniowych grochu i łubinu prowadzono badania nad ilością przyswojonego symbiotycznie azotu przez te rośliny w różnych warunkach glebowych i w 4 różnych okresach wegetacji tych roślin: w okresie przed kwitnieniem, po okwitnieniu, podczas zawiązywania strąków i w czasie dojrzewania nasion. Wyniki, jakie uzyskano, upoważniły autorkę prowadzonych w Instytucie Puławskim badań do wysnucia następujących wniosków: aktywność bakterii symbiotycznych jest proporcjonalna do stężenia hemoglobiny w brodawkach korzeniowych roślin motylkowych; mniejsza lub większa produkcja tego pigmentu związana jest z kolei z warunkami środowiska, w których wzrasta roślina motylkowa. Równocześnie ze znikaniem hemoglobiny z brodawek przyswa-

janie wolnego azotu stopniowo maleje. Z chwilą, kiedy w brodawkach korzeniowych znajduje się tylko zielony pigment, przyswajanie molekularnego azotu jest już ukończone.

Doświadczenia puławskie wykazały nadto, że synteza hemoglobiny w brodawkach korzeniowych roślin zaszczerpionych aktywnym szczepem *Rhizobium* odbywa się dopóty, dopóki starcza węglowodanów w korzeniach. Z chwilą wyczerpania się źródła węgla następuje rozkład hemoglobiny w brodawkach; tworzą się produkty rozkładu komponenty barwnej hemoglobiny i równocześnie nodulacja i przyswajanie wolnego azotu ustaje.

Jak już wyżej powiedzieliśmy, rośliny motylkowe reprezentują pierwszy znany nam wypadek występowania hemoglobiny w świecie roślinnym. Stwierdzone zostało, że ani sama roślina motylkowa, ani same bakterie z gatunku *Rhizobium* (hodowanej na całkowitej pożywce potrzebnej im do wzrostu i rozmnażania się) nie są zdolne do syntetyzowania hemoglobiny, a więc i do przyswajania molekularnego azotu. Nie stwierdzili tego jasno żadni (dotychczas) badacze. Przyswajanie wolnego azotu odbywa się tylko wtedy, gdy czynny szczep bakterii *Rhizobium* rozwinię się w tkance korzeniowej właściwej roślinie motylkowej. *Rhizobium* nie tylko pobudza komórki korzeniowe do szybszego rozrostu i podziału, ale najwidoczniej dostarcza im pośrednio czy bezpośrednio tego czynnika, który jest potrzebny do syntezy hemoglobiny. Keilin twierdzi, że każda żywa komórka może być uważana za potencjalnego „nosiciela” grupy prostetycznej hemoglobiny, a to na tej podstawie, że wszystkie organizmy aerobowe łącznie z bakteriami i roślinami zdolne są do syntetyzowania katalizatorów mających naturę hematynową. Hemoglobinę prawdziwą produkuje jednak (według dotychczasowego stanu badań) tylko i wyłącznie system „rośliny - *Rhizobium*”. System ten najwidoczniej posiada zdolność do produkowania tej wysoce specyficznej części składowej białkowej hemoglobiny, jaką jest „globina”, która w połączeniu z hemem nadaje temu barwikowi charakterystyczną cechę odwracalnego łączenia się z tlenem, czyli „utlenowania”.

LITERATURA

1. *Friedheim E. A. H.*: *Naturwissenschaften*. 21. 177. 1933.
2. *Gugenheim M.*: *Zeits. f. Physiol. Chem.* 88.278. 1913.
3. *Keilin D., Wang Z.*: *Nature*. 3930. 1945.
4. *Keilin D. i Smith J.*: *Nature*. 159. 1947.

5. *Kubo H.*: Acta Phytochim. Japan. 11. 195. 1939.
6. *Palladin W.*: Ber. d. dtsh. Bot. Gas. 26. 125. 1908.
7. *Pietz J.*: Zent. Bakt. Parasitenk. 11. 99. 1938.
8. *Virtanen A. I.*: Acta chemica Scandinavica. 1. 90. 1947.

III. *Wydzielanie azotu z brodawek korzeniowych na zewnątrz*

Spostrzeżenia ostatnich kilkunastu lat wykazały, że rośliny niemotylkowe mogą korzystać z azotu roślin motylkowych nie tylko z produktów rozkładu tych roślin, ale również i za ich życia. Stwierdzono, że rośliny motylkowe mogą już w czasie swego rozwoju wzbogacać glebę w azot przyswojony przez ich symbiotyczne bakterie, a rośliny niemotylkowe rosnące w ich sąsiedztwie mogą ten azot czerpać na swój użytek. Zagadnienie wydzielania związków azotowych do podłoża stało się w ostatnich 10 latach przed wojną tematem dociekań fizjologów, biochemików i mikrobiologów.

Doświadczenia polowe

Pierwsze wzmianki na temat korzyści wynikających z uprawy roślin motylkowych z niemotylkowymi spotykamy w piśmiennictwie rolniczym w r. 1892. Autorem jest La Flize (2), który w latach 1887 — 1892 prowadził w Rambouillet doświadczenia polowe i na ich podstawie wykazał, że rośliny zbożowe siane między roślinami motylkowymi nie potrzebują już nawożenia azotowego dając obfity plon ziarna i słomy. Według autora dobry rozwój roślin zbożowych należy przypisać współżyciu tych 2 gatunków roślin, w szczególności oddziaływaniu związków azotowych przyswojonych przez bakterie brodawkowe roślin motylkowych. Związki te miałyby, według przypuszczeń autora, wędrować z brodawek korzeniowych roślin motylkowych do podłoża roślin i w ten sposób przyczyniać się do lepszego rozwoju roślin niemotylkowych.

W roku 1910 ukazała się praca Lipmana (5) pt. „Metody badania żyzności gleby”. Na drodze ścisłych doświadczeń polowych i wazonowych (z mieszaniną piasku i gleby) próbował autor wytłumaczyć korzyści uzyskane z upraw roślin mieszanych — motylkowych z niemotylkowymi, Wnioski, jakie Lipman wysnuł jedynie tylko na podstawie obserwacji, były następujące: 1) prawdopodobnie związki azotowe wędrują z brodawek korzeniowych do podłoża roślin, z nich zaś korzystają rosnące w sąsiedztwie rośliny niemotylkowe, 2) obecność azotu mineralnego w podłożu wpływa ujemnie na energię wiązania wolnego azotu i na wy-

działanie azotu z brodawek korzeniowych do substratu roślin, skutkiem czego rozwój roślin w mieszance jest zahamowany, 3) różne rośliny motylkowe wpływają w różnym stopniu na rozwój roślin niemotylkowych. Przypuszczenie to wypowiedział Lipman na podstawie doświadczenia porównawczego, uprawiając bowiem w jednej serii owies z grochem, w drugiej owies z soją otrzymał w pierwszym wypadku lepszy plon owsa niż w drugim.

W roku 1911 Lyon i Bizzell (4) ogłosili pracę pt. „Niezwyczajne korzyści uprawiania roślin motylkowych”. Autorzy ci stwierdzili wzrost procentowej zawartości azotu w owsie pod wpływem roślin motylkowych wyrosłych na tym samym terenie. Zjawisko to przypisywali wzmożonej nityfikacji związków azotowych zawartych w glebie, na której rosną rośliny motylkowe. Pogląd ten podzielał Tacke (10), według którego bakterie nityfikacyjne wykazują zwiększoną energię w pobliżu korzeni roślin motylkowych.

Kazerrer (7) w następujący sposób tłumaczy sprawę korzyści uprawy mieszanek: według niego korzenie różnych gatunków roślin tak się wzajemnie przerastają, że trudno je rozdzielić. Kazerrer dochodzi do wniosku, że korzenie różnych gatunków roślin „wysysają” w ten sposób materiały pokarmowe jedne od drugich.

Fergus i Trumble (1, 11) w St. Zjednoczonych badają sprawę korzyści uprawy roślin motylkowych z niemotylkowymi z punktu widzenia praktyki rolniczej: pierwszy z nich prowadził doświadczenia z pastwiskami i stwierdza, że na poletkach z mieszaniną koniczyny i traw pastewnych plon jest 2 razy większy niż na poletkach bez koniczyny, prócz tego znajduje autor znaczny przyrost proteinów w trawach rosnących w sąsiedztwie koniczyny.

Trumble (11) pisze na początku swej pracy: „Ogólnie i od dawna zrobiono spostrzeżenie, że rośliny motylkowe stanowią najodpowiedniejsze sąsiedztwo traw”. Zjawisko tłumaczy autor „przenoszeniem” związków azotowych z roślin motylkowych na niemotylkowe.

W Polsce Gurski (3) zajmował się zagadnieniem uprawy mieszanek: on pierwszy zwrócił uwagę na ilościowy stosunek roślin rosnących w takim zespole. W 3-letnich doświadczeniach autor starał się ustalić najkorzystniejszy stosunek wyki i owsa.

Badania biochemiczne

Naukowe podstawy dla całego zagadnienia współzycia roślin motylkowych z niemotylkowymi stworzył na kilka lat przed wojną Virta-

nen (16). W roku 1927 przeprowadził Virtanen doświadczenie ze szczepionymi roślinami motylkowymi na czystym, bezazotowym piasku i przekonał się, że rośliny te pobrały na swój użytek tylko część azotu przyswojonego przez bakterię *Rhizobium*, w piasku bowiem pozostały jeszcze duże ilości azotu, które według przypuszczeń autora wywędrowały z brodawek korzeniowych koniczyny. W 30 kg piasku znalazł Virtanen, po 11 tygodniach wzrostu rośliny, około 0.84 g azotu, podczas gdy w kontroli (taki sam piasek z nieszczepioną koniczyną) było go tylko 0.04 g. Fakt ten nasunął autorowi przypuszczenie, że z tego azotu mogłyby korzystać rośliny niemotylkowe rosnące obok motylkowych. Przeprowadzone w tym kierunku doświadczenie potwierdziło przypuszczenie Virtanena: owies hodowany obok szczepionego grochu lub wyki dał zwiększony plon i bogatszy w azot niż hodowany w monokulturze w takim samym podłożu. W następnych seriach doświadczenia starał się Virtanen i jego współpracownicy zbadać: 1) czy dyfuzja związków azotowych z brodawek korzeniowych będzie zachodziła w kulturach jałowych, zawierających tylko *Rhizobium*, 2) jaka jest forma chemiczna związków azotowych, które wędrują do podłoża, 3) czy rośliny motylkowe i niemotylkowe mogą się na nich normalnie rozwijać. Poszczególne zagadnienia badał autor w cyklu doświadczeń posługując się tzw. „techniką sterylną”. Technika ta polega na tym, że autor hoduje rośliny motylkową na piasku, agarze lub pumeksie szczepiąc je kulturami bakterii symbiotycznych, a wykluczając wszystkie inne mikroorganizmy. Virtanen znalazł, że wydzielanie azotu z roślin do podłoża odbywa się tylko wtedy, gdy źródło azotu roślin motylkowych stanowi azot przyswojony symbiotycznie, natomiast dyfundowania azotu nie stwierdził wtedy, gdy rośliny nie zaszczepione korzystały tylko z azotu mineralnego. Na tej podstawie Virtanen twierdzi, że wydzielanie azotu odbywa się bezpośrednio z brodawek korzeniowych roślin motylkowych a nie z ich korzeni. Analiza związków azotowych wydzielonych do podłoża wykazała, że są to prawie wyłącznie aminokwasy. Połowę tych związków stanowi kwas asparaginowy, drugą połowę betaalanina i kwas glutaminowy oraz ślady kwasu oksyminobursztynowego. Virtanen nie znalazł w tych wydzielinach (w przeciwieństwie do Winogradzkiego — 14) ani amoniaku, ani azotanów.

W osobnej serii doświadczeń badał Virtanen wartość użytkową aminokwasów dla roślin motylkowych i dla niemotylkowych; doświadczenia te wykazały, że alanina i asparagina nie są dla pszenicy, a zwłaszcza dla jęczmienia, gorszym źródłem azotu od saletry, natomiast kwas asparaginowy jest dla tych roślin nieodpowiednim źródłem azotu. W przeci-

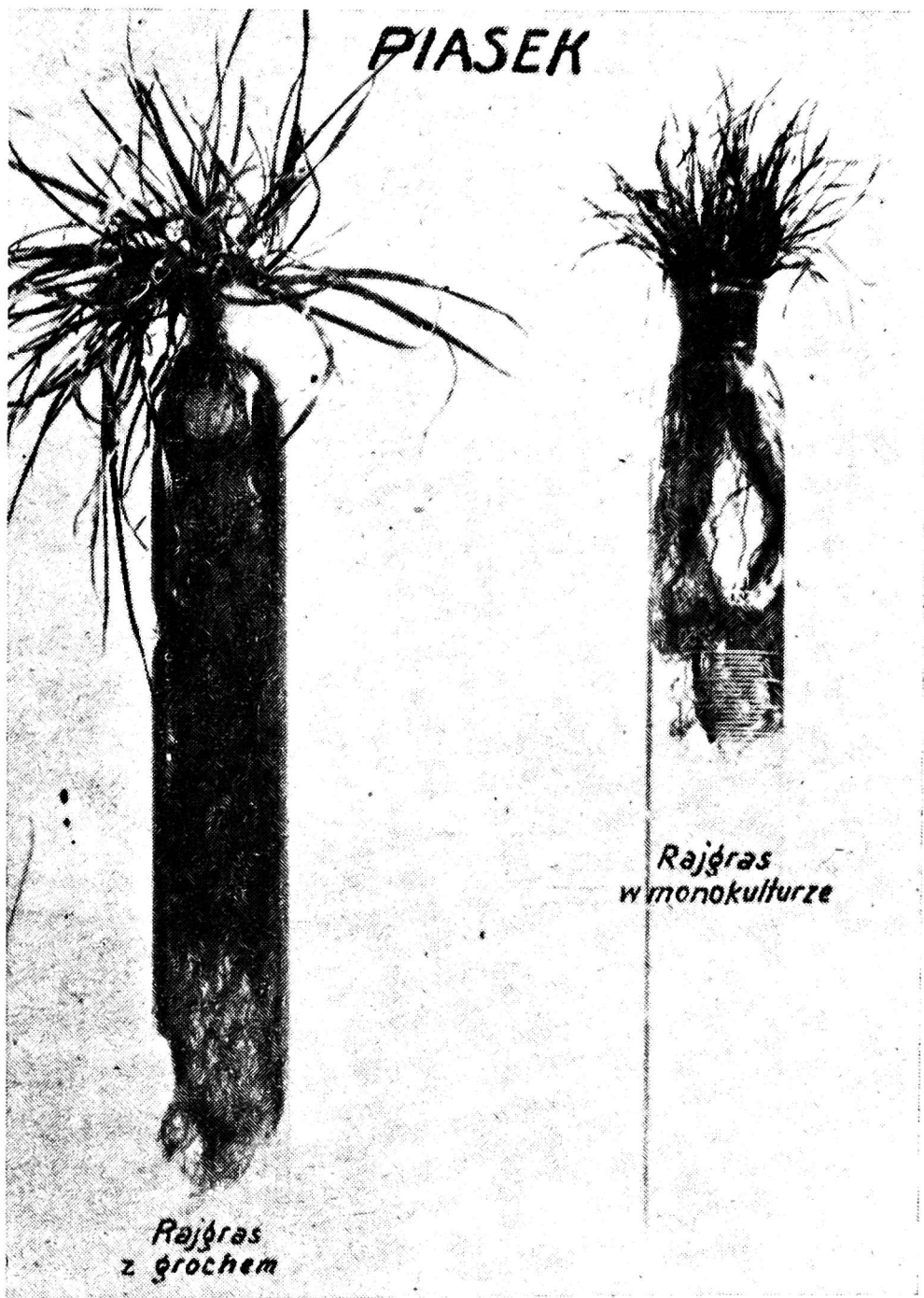
wieństwie jednak do roślin zbożowych posiada on wysoką wartość użytkową dla roślin motylkowych, gdy asparagina jest dla nich niekorzystna.

W roku 1937 przeprowadził Virtanen (17) i jego współpracownicy cykl doświadczeń, w których badali wpływ czynników zewnętrznych na zjawisko wydzielania azotu z brodawek korzeniowych do podłoża. Badania te wykazały, że ilość azotu wydzielonego przez roślinę motylkową zależy nie tylko od rodzaju rośliny motylkowej, ale także od jej wieku (najsilniejsze wydzielanie znalazł Virtanen w okresie kwitnienia rośliny i w okresie kwitnienie poprzedzającym) i od aktywności szczepu *Rhizobium* użytego do zaszczepienia rośliny. Według autora, aktywność danego szczepu mierzy się nie tylko ilością przyswojonego azotu, ale i ilością azotu, który wydyfundował do podłoża.

W ostatnich latach przed wojną przeprowadzono w Instytucie Puławskim (8) badania nad kulturami mieszanymi w szeregu doświadczeń wazonowych na czystym, wolnym od azotu, piasku. Doświadczenia te potwierdziły obserwacje Virtanena w zakresie wędrowania azotu z brodawek korzeniowych roślin motylkowych na zewnątrz korzeni oraz korzyści wynikających dla rośliny niemotylkowej rosnącej obok rośliny motylkowej. Badania te wykazały nadto, że rośliny motylkowe mogą być lepszymi lub gorszymi „odbiorcami” lub „konsumentami” od znajdujących się w odżywczym środowisku wydzielin azotowych. W doświadczeniach tych znaleziono, że plon trawy rosnącej w towarzystwie grochu podniósł się 3-krotnie, natomiast plon jęczmienia hodowanego w tych samych warunkach wzrósł tylko o połowę. Stwierdzono też, że rośliny niemotylkowe mogą tylko wtedy korzystać z azotu roślin motylkowych, gdy okresy najsilniejszego pobierania składników pokarmowych obydwu gatunków roślin mniej więcej się zbiegają; nadto rośliny niemotylkowe muszą posiadać zdolność pobierania na swój użytek tych form związków azotowych, które z brodawek korzeniowych wywędrowały do podłoża.

Z nieopublikowanych dotychczas 2 serii doświadczeń przeprowadzonych w Puławach po wojnie wynika, że rośliny niemotylkowe, rajgras i owies hodowane na różnych rodzajach gleb jak czarnoziem, less, mada czy rędzina nie wykazują ani przyrostu plonu azotu, ani zwiększonego plonu zielonej masy roślin niemotylkowych pod wpływem współżycia z roślinami motylkowymi jak groch lub łubin, przeciwnie, znaleziono wyraźną depresję plonu rośliny niemotylkowej hodowanej w powyższych warunkach. W wypadku hodowania kultur mieszanych motylkowych z niemotylkowymi w takich kombinacjach jak powyżej, ale na czystym bezazotowym piasku zasilonym całkowitą pożywką mineralną,

stwierdzono w obu tych doświadczeniach dyfundowanie azotu z brodawek korzeniowych do podłoża i przyrost plonu rośliny niemotylkowej rosnącej w towarzystwie grochu czy łubinu bez względu na różny przebieg pogody w obu doświadczalnych sezonach* (ryc. 3 i 4).



Rys. 3. Wpływ grochu na plon trawy w kulturze mieszanej

Doświadczenia wazonowe prowadzone przez Ramaszewa (9) z różnymi kombinacjami kultur mieszanych nie na piasku, ale na glebie uprawnej lub na mieszaninie tej gleby z piaskiem również nie wykazały

*) Doświadczenie z r. 1947 przebiegało w pogodę chłodną i wilgotną w okresie długich dni maja i czerwca, doświadczenie 1948 r. — w pełni lata i pierwszych jesiennych, krótkich dniach.

wędrowania do podłoża związków azotowych przyswojonych przez bakterie brodawkowe w ilościach mogących mieć znaczenie praktyczne; według obserwacji tego autora, trawy towarzyszące roślinom motylkowym oddziaływały ujemnie na rozwój tych ostatnich i na proces gro-



Rys. 4. Wpływ grochu na plon trawy w kulturze mieszanej

madzenia przez nie azotu. Szkodliwy wpływ traw zwiększał się przy zwiększonej ilości azotu w glebie. Podobne wyniki otrzymał Ludwig (6). Przeprowadził on cykl doświadczeń badając rozwój całego szeregu kombinacji kultur mieszanych na różnych typach gleb, stosując różne rodzaje pożywek o różnym odczynie i stwierdził prawie bez wyjątku ujemny wpływ roślin motylkowych na rozwój roślin niemotylkowych. Należy nadmienić, że doświadczenia swoje prowadził przy sztucznym świetle o sile 2 200 świec.

Szkoła amerykańska z Wilsonem (1) na czele badała problem omawiany bardzo wszechstronnie i doszła również do przekonania, że zjawisko wydzielania azotu z brodawek korzeniowych na zewnątrz jest raczej wyjątkiem niż regułą. Badacze ci prowadzili doświadczenia tą samą techniką co Virtanen, na piasku pochodzącym z Finlandii i tylko w wyjątkowych wypadkach znaleźli dyfuzję azotu z brodawek korzeniowych roślin motylkowych. Pragnąc wyjaśnić przyczynę tego zjawiska zwrócili uwagę na sprawę fotosyntezy i jej stosunku do asymilacji wolnego azotu przez rośliny motylkowe. Przypuszczają oni, że przyczyną odmienności wyników badań fińskich i amerykańskich były odmienne warunki klimatyczne, temperatura i długość dnia w tych krajach. Doświadczenia prowadzone w tym kierunku wykazały, że niska temperatura i słabe naświetlenie roślin motylkowych sprzyja zjawisku dyfuzji azotu z brodawek korzeniowych do substratu. Strong i Trumble (12) potwierdzili wyniki badań amerykańskich, a Wyss (15) znalazł, że rośliny długiego dnia (a więc dojrzewające wcześniej) wydzielają na zewnątrz brodawek korzeniowych więcej azotu, aniżeli rośliny krótkiego dnia. Reasumując wyniki różnych autorów, którzy badania swoje prowadzili w różnych krajach, a więc w różnych warunkach klimatycznych, Wilson dochodzi do wniosku, że jednym z najważniejszych czynników, wpływających na zjawisko wydzielania azotu z brodawek korzeniowych, jest *fotosynteza*. Jeżeli: 1) fotosynteza jest słaba, rośliny motylkowe słabo asymilują molekularny azot i wtedy wydzielanie azotu z brodawek jest znikomo małe, gdy 2) fotosynteza zachodzi energicznie, symbiotyczne przyswajanie azotu jest przez nią silnie stymulowane, ale szybko rozwijająca się roślina motylkowa zużywa również szybko przyswojony azot i wtedy wydzielania azotu na zewnątrz brodawek nie znajdujemy, 3) jeżeli wreszcie fotosynteza jest na tyle silna, że zapewnia bakteriom rośliny motylkowej dostateczne zasoby energii do wiązania wolnego azotu, ale nie wpływa na nadmierną produkcję węglowodanów, które by natychmiast wiązały symbiotycznie przyswojony azot, wtedy zachodzi zjawisko wydzielania związków azotowych z brodawek korzeniowych roślin motylkowych do ich środowiska odżywczego.

Wilson (13) zwraca uwagę na jeszcze jeden czynnik, a mianowicie na produkcję przez roślinę motylkową kwasu szczawiowo-octowego. Virtanen (17, 18) znalazł w roślinach motylkowych znacznie większe ilości tej substancji, aniżeli badacze amerykańscy. Ta duża ilość kwasu szczawiowo-octowego, znaleziona w roślinach motylkowych rosnących w warunkach klimatu fińskiego, wiąże natychmiast, przypuszcza Wilson, przyswojone symbiotycznie związki azotowe na kwas asparaginowy, któ-

ry to związek znalazł Virtanen w wydzielinach brodawek korzeniowych roślin motylkowych.

Widzimy więc, jak wiele czynników odgrywa rolę przy zjawisku asymilacji wolnego azotu i zjawisku wydzielania przyswojonych i przerobionych przez roślinę lub bakterie połączeń azotowych. Doświadczenia prowadzone tą samą techniką, z tymi samymi roślinami dają różne wyniki zależnie od tego, czy prowadzone były w Rothamsted, w Helsinkach, w Madison czy w Puławach. Wydaje się, że Finlandia posiada najwłaściwsze warunki klimatyczne dla zjawiska wydzielania azotu z brodawek korzeniowych do podłoża. — Jak wynika z doświadczeń przeprowadzonych w Puławach, ważną rolę w tym zjawisku odgrywa środowisko, w którym rozwijają się rośliny współżyjące: motylkowe z niemotylkowymi. Wszystkie doświadczenia puławskie z tego zakresu wykazały, że rośliny motylkowe wzbogacają za życia podłoże w azot i że z jego związków korzystać mogą rośliny niemotylkowe rosnące w zespole. Zjawisko to zaobserwowano jednak tylko na czystym piasku, tj. w warunkach absolutnego minimum azotu w tym środowisku zarówno w sezonie długich jak i krótkich dni, natomiast na glebach naturalnych stosunkowo zasobniejszych w azot wędrowania azotu i korzyści stąd płynącej dla rośliny niemotylkowej nie znaleziono.

Mieszane siewy roślin motylkowych z niemotylkowymi mają szerokie zastosowanie w praktyce rolniczej. Mieszanki takie dają rolnikowi przede wszystkim korzyści natury uprawowej oraz plon bogatszy w azot, a więc treściwszą paszę. Jednakże problem wzbogacenia gleby w azot przy uprawie mieszanek przez wydzieliny azotowe roślin motylkowych dotychczas w praktyce nie był brany pod uwagę. Na podstawie naszych dotychczasowych doświadczeń „nawożenie” gleby wydzielinami brodawkowymi roślin motylkowych zachodziłoby w warunkach naszego klimatu tylko na luźnych piaskach, przy zasadniczym ubóstwie tych gleb w związki azotowe. Taka korzyść ze współżycia roślin motylkowych z niemotylkowymi byłaby może istotną przy odpowiednim doborze współżyjących roślin pod względem ich jakości i ilości, przy czym długość okresów wegetacyjnych roślin zespołowych odgrywałaby ważną rolę. Cała ta sprawa wymaga zbadania w warunkach polowych.

LITERATURA

1. *Fergus E. N.* The place in pasture production. Journ. Amer. Soc. Agron. 27. 367. 1935.
2. *La Flize S.* Experiences sur les legumineuses. An. Sci. Agron. 9. 174. 1892.

3. *Gurski H.* O siewach mieszanych. Doświadc. rol. III. 55. 1927.
4. *Lyon T. L. i Bizzell J. A.* N. Y. Cornell Univ. Agric. Exper. St. Bull. 294. 1911.
5. *Lipman J. G.* The associative growth of legumes and non legumes. New Jersey Agric. Exper. St. Bull. 253 (1912). Journ. of Agricul. Sc. 3. 1910.
6. *Ludwig C. A. i Franklin Allison.* Experiences concerning dision, of nitrogenous compounds from healty legume nodules or roots. Botan. Gaz. 98. 680. 1937.
7. *Kazerrer H.* Beobachtungen über die Bewurzellung der Kulturpflanzen bei Reinsaat und bei Mischaat. Zeit. f. d. Landw. Versuchs. Oesterreich. 14. 1022. 1911.
8. *Nowotnówna A.* Wpływ roślin motylkowych na rozwój traw i roślin zbożowych w kulturach mieszanych. Pamiętn. Inst. w Puławach. 16. 101. 1936.
9. *Romaszew P.* Wykorzystanie azotu roślin motylkowych przez trawy w siewach mieszanych Chim. Soc. Zemel 11. 28. 1936.
10. *Tacke E.* Pract. Blat. f. Pflanzenbau u. Schutz J. 145. 1909.
11. *Trumble H. C.* Journ. Austral. Inst. Agric. Sc. 1. 117. 1935.
12. *Trumble H. C. a. Strong T. H.* Austral. Council. Sc. Ind. Research Bull. 105. 11. 1937.
13. *Wilson P. W.* The biochemistry of nitrogen fixation. The Univers. of Visconsin Proos. 42 i 163. 1940.
14. *Winogradzki S.* Zentralbl. Bact. 2. 97. 399. 1938.
15. *Wyss, O. a Wilson P. W.* Soil Sc. Proc. 2. 289. 1937.
16. *Virtanen A. I., Synnöve v. Hausen.* Zeit. Pflanzen. Düng. u. Bodenk. A. 21. 57. 1931.
17. *Virtanen A. I., v. Hausen S., Laine T.* Journ. Agr. Sc. 27 332. 1937.
18. *Virtanen A. I.* wg The Biochemistry of Nitrogen Fixation. The University of Visconsin Press. 161. 1940.

IV. Wpływ mikroelementów na rozwój roślin motylkowych

Badania nad mikroelementami, prowadzone od kilkadziesiąt lat na wielką skalę, wykazały, że bor, mangan, miedź, molibden i inne są składnikami niezbędnymi w żywieniu roślin; ważności tych składników nie zmniejsza fakt, że są one potrzebne roślinom nieraz tylko w znikomych ilościach i że te ilości zależne są od najrozmaitszych czynników, jak klimat, rodzaj gleby i rośliny. Stwierdzono, że mikroelementy działają na rozwój roślin specyficznie i bezpośrednio i że cykl rozwojowy roślin nie może być całkowicie ukończony, jeżeli w pożywce roślin brak jest choćby jednego z potrzebnych jej mikroelementów. — Rośliny motylkowe należą do roślin, których zapotrzebowanie na mikroelementy zostało już obszernie opracowane. Znaleziono, że niektóre z mikropierwiastków,

jak bor, molibden lub vanad odgrywają ważną i niezastąpioną rolę w rozwoju tych roślin, w szczególności w procesie symbiotycznego przyswajania azotu.

Bor. Rolę boru najbardziej wyczerpująco opracowali Brenchley i Thornton (5). Badania ich poprzedników wykazały przeważnie ujemne działanie związków boru na rośliny motylkowe. Prace Brenchleya i Thorntona wyjaśniły, że przyczyną tych ujemnych objawów była dawka boru stosowana w nadmiernej ilości. Autorzy ci wykazali, że bor w pewnych granicach stężenia wpływa korzystnie na rozwój systemu naczyniowego brodawek korzeniowych, co ułatwia dopływ węglowodanów do brodawek korzeniowych stanowiących, jak wiadomo, źródło energii dla bakterii symbiotycznych. Według tych autorów dodatnie działanie boru potęguje się, jeśli obok boru znajduje się w pożywce określona ilość wapnia. Obecność boru w pożywce wpływa na silniejsze pobieranie wapnia, przy czym większe jego wyzyskanie powoduje z kolei lepszy rozwój rośliny motylkowej. Sprawę tę tłumaczy Peive (20) w następujący sposób: natychmiast po stosowaniu wapnowania gleby, mikroflora glebowa rozwija się silnie, a roztwory glebowe bogate są w jony Ca. Na skutek wzmożonego pobierania tych jonów przez rośliny, normalny stosunek wapnia do potasu i wapnia do boru zostaje zakłócony i roślina produkuje mniej węglowodanów, bakterie zaś, których ilość na skutek sprzyjających warunków dla ich rozwoju zwiększyła się, zamieniają się z symbiontów w pasożyty i atakują samą roślinę powodując wszystkie te symptomy chorobowe, które badacze przypisywali wapnowaniu gleb. Wprowadzenie w tych warunkach nowych dawek boru do gleby przywraca równowagę między jonami wapnia, boru i potasu, co z kolei podnosi syntezę węglowodanów i ich transport do brodawek korzeniowych. Tak więc wpływ boru na rośliny motylkowe byłby dwójaki: 1) bor podnosi aktywność mikrobiologiczną gleby, 2) reguluje procesy biologiczne w samej roślinie. Według Eatona (11) bor wpływa na produkcję auksyn przez rośliny motylkowe, dlatego brak tego mikroelementu w pożywce rośliny motylkowej powoduje zaburzenia w procesie wiązania wolnego azotu.

Cusumano, Collings (8, 9) i inni badali wpływ boru na rozwój bobu, soi i grochu. Według tych autorów obecność boru w pożywce wpływa dodatnio na aktywność bakterii brodawkowych, przy czym wpływ boru na samą roślinę wyraża się przede wszystkim w ilości i wielkości ziarna, a niedobór boru wpływa na produkcję słomy kosztem ziarna. Badania przeprowadzone w Instytucie Puławskim (18, 19) nad działaniem boru na rozwój łubinu i soi wykazały, że bor wpływa korzystnie na

pobieranie przez rośliny podstawowych składników pokarmowych jak azot, wapń i potas. Według tych badań rola boru polega także na uruchomieniu składników pokarmowych ze starszych części rośliny do młodszych, dzięki czemu rośliny nawożone borem produkują więcej ziarna niż rośliny hodowane na podłożu pozbawionym boru. Według Bielousowa i Bobko (1) szkodliwe działanie nadmiaru wapnia na rozwój żółtego łubinu polega przede wszystkim na zahamowaniu działalności boru w roślinie przez wapno. Dodatkowe dostarczenie tego składnika roślinie usuwa lub osłabia szkodliwe działanie wapnia. Doświadczenia puławskie (19) wyjaśniły, że ujemne działanie wapnia na łubin żółty polega na zahamowaniu odpływu pobranych przez roślinę składników pokarmowych z części wegetatywnych do ziarna. Nawożenie borem bogatego w wapń podłoża wpłynęło na uruchomienie tych składników i w rezultacie ułatwiło roślinie wyprodukowanie znacznie większych ilości ziarna niż przy nawożeniu samym wapniem. Orientacyjne doświadczenia Brenchley'a (6) zaliczyły soję do roślin przyswajających bor z wielką korzyścią dla swego rozwoju. Collings (8) stwierdził, że bor w granicach niskiego stężenia pobudza energiczny rozwój tej rośliny. Doświadczenia przeprowadzone w Puławach wykazały, że dawki boru zbyt duże wywołują silne zmiany morfologiczne soi objawiające się żółknięciem i deformacją liści.

Według Bertranda (2) rośliny motylkowe należą do roślin najbogatszych w połączenia borowe. Ilość boru w tych roślinach waha się w granicach od 8 — 95 mg na kg suchej masy roślin.

Molibden. Dużo uwagi poświęcili różni badacze sprawie działania molibdenu na asymilację azotu przez *Azotobacteria* i przez *Rhizobia*.

Znaleziono (14, 15), że pewne minimum tego składnika w pożywce roślin jest niezbędne do wiązania molekularnego azotu. Tłumaczono to zjawisko katalitycznym działaniem molibdenu na cały proces przyswajania wolnego azotu. Ter Meulen (21) znalazł, że nasiona roślin motylkowych są szczególnie bogate w molibden; analiza różnych gleb wykazała, że piaski luźne zawierają znikome ślady tego składnika, więcej zawierają go gleby piaszczyste, bo około 0,001 mg na 1 kg gleby, natomiast gleby żyzne mają nawet 0,1 — 0,2 mg molibdenu na 1 kg gleby. Winogradowa (22) znalazła, że nasiona koniczyny, wyki czy łubinu zawierają około $5,5 \times 10^{-4}\%$ Mo, nasiona roślin niemotylkowych około $4 \times 10^{-5}\%$ Mo. Jensen (14) zwraca uwagę na to, że molibden odgrywa jedynie rolę w samym procesie wiązania azotu wolnego, a nie wpływa bezpośrednio na rozwój samych roślin; Jensen przeprowadził doświadczenie z czerwoną koniczyną hodowaną albo na saetrze sodowej,

albo bez saletry, ale szczepioną kulturami bakterii *Rhizobium* i znalazł dodatnie działanie molibdenu tylko w tym wypadku, gdy roślina korzystała z azotu przyswojonego symbiotycznie. Podobne doświadczenie przeprowadził ten badacz (15) z lucerną w czystych kulturach piaskowych. Autor znalazł, że dodatek molibdenu do pożywki wpłynął przede wszystkim na lepszy rozwój brodawek korzeniowych tej rośliny i energiczniejsze przyswajanie wolnego azotu. Według doświadczeń tegoż autora jedna część molibdenu wiąże 37 000 części molibdenu. Analizując rośliny motylkowe na zawartość w ich popiele molibdenu stwierdził Jensen, że najwięcej tego składnika znajduje się w brodawkach korzeniowych roślin motylkowych, mniej jest ich w korzeniach a najmniej w częściach zielonych rośliny.

Bobko i Sawina (4) badali wpływ molibdenu na rozwój grochu w kulturach wodnych i znaleźli, że groch hodowany na pełnej pożywce bez molibdenu nie posiadał brodawek korzeniowych, jakkolwiek zaszczepiony był aktywnym szczepem *Rhizobium*, natomiast groch hodowany w tych samych warunkach, ale z dodatkiem 0,5 mg Mo na 1 l pożywki wykazywał obfite brodawkowanie.

Burk (7) twierdzi, że molibden wchodzi w skład systemu enzymatycznego katalizującego proces przyswajania wolnego azotu. Bortels (3) zaobserwował, że molibden i vanad pobudzają roślinę motylkową do silniejszego przyswajania molekularnego azotu. Wyraźne wyniki otrzymano w doświadczeniach polowych przy nawożeniu tymi składnikami. Następująca tabela ilustruje wyniki tych badań:

Plony świeżych roślin w kg

Kontrola	Molibden	Vanad	Molibden + Vanad
Lucerna 12,1	15,2	15,8	14,3
Łubin - 87,7	115,5	102,2	92,3

Podobne doświadczenie z żółtym, słodkim łubinem przeprowadzone w Puławach w warunkach doświadczenia wazonowego na czystym piasku, zaopatrzonym w całkowitą pożywkę mineralną bez związków azotowych.* Nasiona łubinu zostały zaszczepione kulturami bakterii *Rhizobium*. Stwierdzono, że nawożenie molibdenianem amonowym w ilości 5 mg Mo na 10 kg piasku wpłynęło szczególnie dodatnio na odkładanie ziarna przez łubin (rys. 5, 7). Ilość symbiotycznie przyswojonego azotu wzrosła w seriach z molibdenem w porównaniu z kontro-

* Doświadczenie jeszcze nie opublikowane.

lą o około 30%. Znalezione, że korzenie roślin hodowanych na pożywce z molibdenem miały brodawki znacznie większe i szersze niż korzenie roślin hodowanych w tych samych warunkach, ale bez molibdenu. (rys. 6).

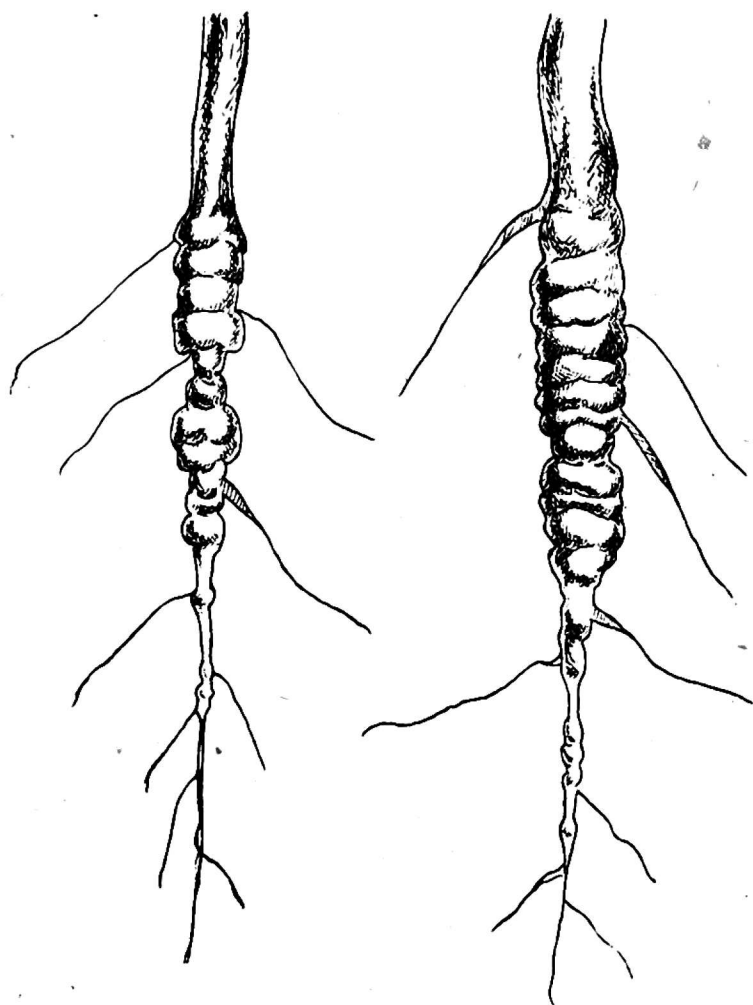


Rys. 5. Wpływ molibdenu na rozwój żółtego (słodkiego) łąbiny (w kulturach piaskowych)

Tytan. Analiza spektroskopowa stwierdziła obecność tytanu w brodawkach korzeniowych lucerny, wyki, soi, czerwonej koniczyny i innych roślin motylkowych. Badania wegetacyjne wykazały dodatni wpływ soli tytanu na ilość i wielkość brodawek korzeniowych tych roślin. Brodawki te pojawiły się wcześniej i wykazywały większą energię wiązania azotu w wypadku, gdy rośliny zasilano solami tytanu (16).

Vanad. Vanad również odgrywa stymulującą rolę w procesie wiązania wolnego azotu przez rośliny motylkowe, ale działanie jego jest słabsze niż działanie molibdenu. Znalezione, że pierwiastek ten może częściowo zastąpić molibden, ale wtedy ilość przyswojonego symbiotycznie azotu jest w przybliżeniu o połowę mniejsza niż przy stosowaniu samego molibdenu (3).

Gericke (12, 13) stwierdził, że tomasyna zawiera około 0,5% soli vanadu. Nawożąc rolę tomasyną wprowadzamy do gleby ten pierwiastek. Gericke badał wpływ wapniowej soli vanadu na rozwój czerwonej koniczyny w piaskowych kulturach wazonowych. Znalazł wzrost plonu koniczyny w granicach 3 — 5% pod wpływem 30 mg V na 7 kg piasku; ponadto stwierdził silny rozwój systemu korzeniowego koniczyny pod wpływem vanadu i zwiększone przyswajanie wolnego azotu. Doświad-



*na piasku bez
molibdenu*

na piasku + 5 mg Mo.

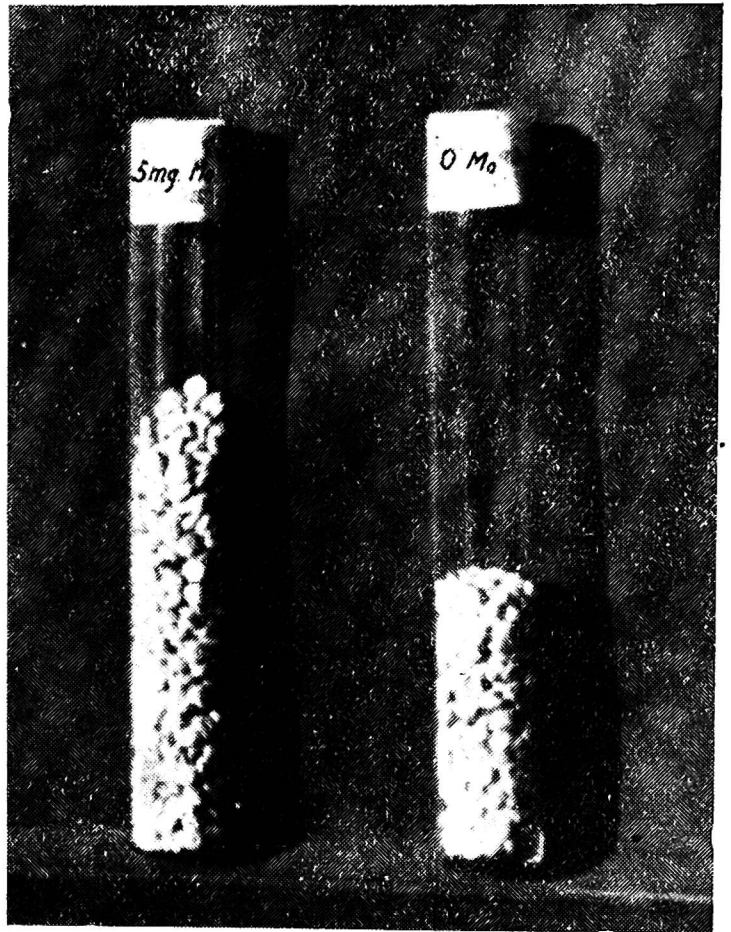
Rys. 6. Brodawki korzeniowe (słodkiego) łubin u żółtego, hodowanego: a) na piasku — bez molibdenu, b) na piasku — + 5 mg Mo

czenie polowe, przeprowadzone przez tegoż badacza — również wykazało dodatnie działanie vanadu na proces wiązania atmosferycznego azotu przez rośliny motylkowe.

Rad. Badano wpływ pierwiastków radioaktywnych na rozwój brodawek korzeniowych roślin motylkowych i na przyswajanie wolnego azotu. Stwierdzono, że w kulturach wodnych asymilacja atmosferycz-

nego azotu zachodziła tylko w tym wypadku, gdy do pożywki roślin dodano znikomą ilość radu. Dawką optymalną okazała się dawka $10 - 10^{-10}$ g Ra (10).

Jod. Leroux i Désiré (17) stwierdzili obecność tego pierwiastka w nasionach wszystkich roślin motylkowych. Według autorów obecność jodu w pożywce roślin motylkowych wpływa na zwiększone przyswajanie wolnego azotu przez te rośliny.



Rys. 7. Wpływ molibdenu na plon żółtego (słodkiego) łubinu (w kulturach piaszkowych)

ZAKOŃCZENIE

Kilka słów o gospodarczym znaczeniu roślin motylkowych

Już starożytni Grecy i Rzymianie doceniali znaczenie gospodarcze roślin motylkowych. Juliusz Varro opisuje metody zielonego nawożenia (dzieło, które do dzisiejszego dnia nic nie straciło ze swego znaczenia) a Columella (pierwsze stulecie po Chr.) poświęca w swojej książce „De re rustica” kilka ustępów roślinom motylkowym, w szczególności lucernie, łubinowi i wyce. Między innymi zwraca autor tego dzieła uwagę na to, że łubin należy przyorywać na zielony nawóz w jego wczesnym okresie wegetacji; autor podnosi też wysoką wartość lucerny, która w ciągu jednego roku sezonu daje kilka pokosów „sama sobie nawożąc glebę”.

Już wtedy zdawano sobie sprawę z niezastąpionej roli pokarmów białkowych w odżywianiu ludzi i zwierząt. Dla podkreślenia tego zna-

czenia nadano im nazwę „proteiny” od greckiego słowa „proteos”. Białka wchodzi w skład żywej plazmy obok węglowodanów, lipidów i in. Są one główną masą budulcową organizmów zwierzęcych. Stanowią część składową enzymów, czyli tych bioelementów, które powodują ciągłe przemiany chemiczne organicznej substancji żywych komórek; znajdują się w hemoglobinie roznoszącej życiodajny tlen w ustroju zwierzęcym, związane z grupą prostetyczną hemu jako „globina” obdarzona specyficznymi własnościami i specyficzną budową. Aby wytworzyć te różnorodne proteiny organizm zwierzęcy musi otrzymywać stale pewne minimum białka w pożywieniu. Część spożytego białka ulega utlenieniu i stanowi w ten sposób źródło energii dla organizmu, część dostarcza temuż organizmowi aminokwasów będących budulcem białka ustroju. Ale ani człowiek, ani zwierzę nie jest w możności wyprodukowania chociażby najprostszego aminokwasu. Zdolność tę posiadają tylko rośliny, które pobierają z gleby nieorganiczne połączenia azotowe i przetwarzają je na ciała białkowe przyswajalne przez zwierzęta i ludzi. Dlatego to azot odgrywa tak decydującą rolę w żywieniu roślin. Jak jednak sprostać temu zapotrzebowaniu na azot dla tak olbrzymiej i wciąż przyrastającej masy ludzkiej naszego globu? Jak wyrównać straty azotu wynikłe z erozji i fizjologicznego wydalania? Część azotu wraca pod postacią obornika do gleby, nieznaczna część pokrywają nawozy azotowe. Olbrzymią resztą pokryć można tylko czerpiąc ten składnik z atmosfery, która posiada jego nieograniczone zapasy. Znajduje się on jednak w powietrzu tylko jako wolna drobina, a ani rośliny, ani zwierzęta nie mogą z niego korzystać, dopóki nie jest związany z innym jeszcze pierwiastkiem. Dlatego jednym z największych sukcesów naszego przemysłu jest wynalazek procesu wiązania molekularnego azotu z wodorem na amoniak i jego dalsze połączenia. Pomimo jednak wciąż rosnącej sieci fabryk „syntetycznego azotu” nie są one w stanie, według opinii ekonomistów, pokryć całego zapotrzebowania na azot. Skąd brać tę resztę? Może nam dać ją tylko biologiczne wiązanie azotu, a mianowicie: 1) symbiotyczne przez rośliny motylkowe i 2) niesymbiotyczne przez działalność *Azotobacteria*, *clostridium* i innych mikroorganizmów glebowych. Te dwa naturalne źródła azotu mogą jedynie pokryć straty azotu i zaspokoić potrzeby przyrastającej masy ludzkiej. Obliczono, że aby uzyskać jeden milion ton wolnego azotu potrzeba roślin motylkowych zajmujących 10 — 20 milionów hektarów ziemi. Kraje tak bogate jak Związek Radziecki i Stany Zjednoczone Ameryki Północnej zdają sobie już od dawna sprawę, że tylko rośliny motylkowe mogą w przyszłości zabezpieczyć ludzkość przed głodem azotu. Zwraca na tę sprawę uwagę *Prianisz-*

nikow w swej książce pt. „Azot w życiu roślin i w rolnictwie ZSRR“ * podkreślając w niej z naciskiem szczególne znaczenie roślin motylkowych. Są to bowiem jedyne rośliny, które mogą się obejść bez źródła azotu w glebie, a które wykazują tym większą aktywność w symbiotycznym wiązaniu azotu, im gleby uboższe są w połączenia azotowe. Rośliny motylkowe nie tylko gromadzą azot na swój własny użytek, ale część tego azotu dyfundują z brodawek korzeniowych do podłoża i w ten sposób wzbogacają glebę w ten składnik. Dlatego też wysiłki krajów rolniczych idą w tym kierunku, aby podnieść w nich uprawę roślin, które słusznie noszą nazwę „zbieraczy azotu” w odróżnieniu od roślin takich jak zbożowe, które nazywamy „pożeraczami azotu”.

Jeżeli jednak ta szczególnie gospodarczo ważna rola roślin motylkowych została już od dawna zrozumiana, to wciąż jeszcze nie można tego powiedzieć o całym problemie wiązania wolnego azotu z powietrza przez rośliny motylkowe. W naszych krótkich referatach przedstawiliśmy tylko niektóre zagadnienia całego skomplikowanego zjawiska asymilacji molekularnego azotu, a mianowicie tylko te, w których badaniu autorka brała udział. Widzimy w nich jednak, jak daleka jest jeszcze droga do całkowitego wyświelenia tej sprawy.

Badacze z różnych stron świata stosują coraz bardziej udoskonalone metody pracy i pomimo to wciąż jeszcze nie dali nam jasnego obrazu, jak ten proces przebiega w systemie rośliny — bakterii. Widzieliśmy, że różni uczeni stosując te same metody badawcze otrzymują niejednokrotnie różne wyniki tylko dlatego, że pracują w różnych krajach, a więc w odmiennych warunkach klimatycznych. Nie wiemy wciąż dokładnie jeszcze jak wygląda mechanizm wiązania azotu, jak na niego wpływają warunki żywienia rośliny (a więc i mikroelementy), nie znamy roli hemoglobiny w tym mechanizmie, nie jest nam wciąż jeszcze dokładnie znany chemizm enzymów zatrudnionych w całym kompleksie metabolizmu azotowego roślin motylkowych. Miejmy jednak nadzieję, że te niekompletne jeszcze, a często jakże rozbieżne wyniki badań różnych uczonych, sprawy wiązania azotu przez system symbiotyczny nie tylko nie zaciemnią, ale przeciwnie, przyspieszą wszechstronne oświetlenie całego zjawiska wiązania molekularnego azotu, którego powietrze jest źródłem niewyczerpanym.

LITERATURA

1. *Bielousow M. A. i Bobko E. W.* An. de la T. 3. Nr 4. 1933.
2. *Bertrand G. Silberstein L.:* Com. Rend. Acad. Agron. France 27. 24. 1941.

* Moskwa, wyd. Akademii Nauk Rolniczych im. W. Lenina, 1945 r.

3. *Bortels H.* Archiv. Microbiol. 1 (1930) 333. Archiv. Microbiol. 8. (1937) 13.
4. *Bobko E. V. i Sawina A. G.* Com. Rend. Acad. Sc. ZSRR 29. Nr 7. 507. 1940.
5. *Brenchley W. E. i Thornton N. G.* Proc. Roy. Soc. T. 98. 373. 1925.
6. *Brenchley W. E.* wg ref. Ziets f. Pflanzenern. Düng. u. Bodenkunde. T. 21. 1926.
7. *Burk D. i Horner C. K.* Third Intern. Cong. Soil Sc. Trans. 1. 152. 1935.
8. *Collings G. W.* Soil Sc. T. XXXIII. 83. 1927.
9. *Cosumano A.* wg ref. Zeits. f. Pflanzenern. Düngung u. Bodenkunde B. T. 12. 209. 1928.
10. *Drobkow A. H.* Com. Rend. Acad. Sc. ZSRR 49. 224. 1945.
11. *Eaton T. M.* Bol. Gaz. 101. 700. 1940.
12. *Gericke S. i Rennenkampf E.* Prak. Blätter d. Pflanzenbau u. Pflanzenschutz. 17. 1722. 1939.
13. *Gericke S.* Bodenkunde u. Pflanzenern. 23. 342. 1941.
14. *Jensen H. L. i Betty R. C.* Proc. Linnean Soc. N. S. Wales. 68. 1. 1943.
15. *Jensen H. L.* Proc. Linnean Soc. N. S. Wales. 70. 203. 1945.
16. *Konishi K. i Tsuge T.* wg P. W. Wilson. The Biochemistry of Symbiotic Nitrogen Fixation, The University of Wisconsin Press. 216. 1940.
17. *Leroux Désirè.* Com Ren, 212. 504. 1941.
18. *Nowotnówna A.* Pamiętnk puławski. T. XV. 19. 1934.
19. *Nowotnówna A.* Pamiętnik puławski. T. XVI. 49. 1935.
20. *Peive Ya. V.* wg Imp. Buro of Soil Sc. Techn. Com. 39. 1940.
21. *Ter Meulen* Biochemie der Spurelemente von K. Scharres. 1941.
22. *Winogradowa K. G.*: Dokłady Akad. Nauk. ZSRR 40. 26. 1947.
23. *Wilson P. W. i Burris R. N.* Bacteriol. Review. 11. 1. 1947.