
E. PÄRSIM
EESTIS KASVAVATE
LIBLIKÕIELISTE
MÜGARBAKTERID



A – 30256

EESTI NSV TEADUSTE AKADEEMIA
EKSPERIMENTAALBIOLOOGIA INSTITUUT

E. PÄRSIM

EESTIS KASVAVATE LIBLIKÕIELISTE MÜGARBAKTERID

KIRJASTUS „VALGUS" · TALLINN 1969

58
P94

Kaane kujundanud U. Külv

УДК. 630 : 576.8

Клубеньковые бактерии бобовых растений в Эстонской ССР. Э. В. Пярсим. Изд.-во «Валгус», Таллин, 1969 г.

Симбиоз клубеньковых бактерий с бобовыми растениями имеет не только большое практическое значение для народного хозяйства как способ повышения урожайности сельскохозяйственных культур и азотное удобрение почв, но и является одним из интереснейших загадочных явлений в биологии, основные теоретические аспекты которого остаются все же нерешенными, несмотря на значительные усилия исследователей.

В настоящей монографии дается обобщение обширного литературного и собственного экспериментального материала в области биологической фиксации азота. Анализируется деятельность клубеньковых бактерий в симбиозе с бобовыми растениями. Излагаемый материал имеет теоретическое и практическое значение в уточнении классификации клубеньковых бактерий, при инфицировании бобовых растений и в использовании новых штаммов при изготовлении нитрагина.

Таблиц 29. Иллюстраций 31.

2—10—2

TARTU ÜLIKOOLI
RAAMATUKOGU

SISSEJUHATUS

Suurte põllumajandussaakide saamine ei ole mõeldav ilma küllaldaste mineraalväetiste koguste kasutamiseta. Seejuures on kõige suurem defitsiit mineraalsetest lämmastikväetistest. Kuigi neid väetisi toodetakse 1970. aastal plaani järgi 6,191 miljonit tonni (arvestatult puhtale lämmastikule), seega üle 3,5 korra rohkem kui 1963. aastal, katab see kogus siiski ainult poole teravilja ja tehniliste kultuuride vajadustest. Kui aga arvestada, et osa toodetavast väetisest kasutatakse muudeks otstarveteks (tööstuses, ekspordiks), kujuneb defitsiit veelgi suuremaks. Seejuures on hoopiski arvesse võtmata põllumaa suurendamine selle aja vältel, rohumaade väetamise vajadus jm. (Mišustin ja Peterburgski, 1965).

Sellest tulenevalt jääb ka edaspidi päevakorda ülesanne leida võimalusi taimede poolt omastatava lämmastiku saamiseks teistest allikatest.

Nimetatud probleemi lahendamisel võivad suurt osa etendada õhulämmastikku siduvad mikroorganismid. Paljud kirjanduse andmed näitavad, et bioloogilise lämmastiku osatähtsus maaviljeluses on väga suur. Näiteks Kolari ja Greenlandi (tsit. Mišustin, 1962) arvestused lämmastiku bilansi kohta maailma põllumajanduses näitavad, et aastase produktsiooniga viiakse mullast välja ligikaudu 100 miljonit tonni lämmastikku, millest mineraalväetistega kompenseeritakse ainult 12 miljonit tonni. Autorite arvates kaetakse vastav defitsiit lämmastiku arvel, mida koguvad õhulämmastikku siduvad mikroorganismid.

Mišustini (1962) andmetel koguvad liblikõielised taimed sümbioosis mügarbakteritega NSV Liidus igal aastal mulda umbes 3,5 miljonit tonni, mullas vabalt elunevad lämmastikusidujad aga 1,5 miljonit tonni lämmastikku.

Nagu Lipmani ja Conybeare'i arvutused (1936, tsit. Pochon, de Barjac, 1960) näitavad, koguneb Ameerika Ühendriikides kultuuristatud mulda igal aastal 16,45 miljonit tonni lämmastikku, kusjuures 9,83 miljonit tonni, s. o. 60% langeb mikroorganismide arvele, sellest ainuüksi mügarbakterite arvele 5,46 miljonit tonni.

Et bioloogiline lämmastik omandaks põllumajanduses veelgi suurema erikaalu, on vaja kõigepealt järjekindlalt ja põhjalikult läbi uurida selle probleemi põhilised teoreetilised aspektid.

Imšenetski (1963) ja Mišustin (1965) peavad praegusel etapil eriti oluliseks süvendada teoreetilisi uurimisi. Eeskätt on vaja uurida mügarbakterite süstemaatikat, lämmastiku sidumise mehhanismi ja taimede vastuvõtlikkust mügarbakterite infektsioonile.

Paljude uurijate (Prjanišnikov, 1945; Fjodorov, 1952; Tjurin, 1954; Pochon, de Barjac, 1960, jt.) andmetel seovad mügarbakterid sümbioosis liblikõielistega aasta jooksul 65—400 kg õhulämmastikku 1 ha kohta. Võrdluseks olgu öeldud, et mullas vabalt elunevad mikroorganismid seovad õhulämmastikku 20—150 kg 1 ha kohta (Kalininskaja, 1962).

Tuleb silmas pidada, et mügarbakterite ja liblikõieliste taimede vahelise sümbioosi tagajärjel seotud lämmastik moodustab praegu enamiku (60%) põllumajanduslikus produktsioonis olevast lämmastikust.

Mügarate ja mügarbakterite leviku käsitlemisel on piirdutud enamasti kultuurtaimedega. Nende esinemisele ja iseloomule metsikute liblikõieliste juures on väga vähe tähelepanu pööratud. Üsna põhjendatuks tuleb pidada arvamust (E. ja O. Allen, 1961), et meie ei tunne veel kõiki mügarbakterite vorme. Ülevaade sellest pakuks aga huvi. On võimalik, et metsikult kasvavatelt taimedelt isoleeritud mügarbakterite tüvedest saab mõningaid kasutada praktilises selektsioonitöös. Tuleb märkida, et põllumajanduses ja tööstuses kasutatavate bakterite selektsiooni üks allikaid on just nende looduslikud vormid (Petrosjan, 1959).

Nitragiini valmistamiseks tuleb selekteerida kõige efektiivsemad tüved. Paljud uurijad on leidnud, et kohalikud tüved on mujalt pärinevatest efektiivsemad. Nähtavasti on kohalike tüvede puhul tegemist värskelt eraldatud bakteritega, mis on sageli efektiivsemad kui kaua aega laboratooriumides kultiveeritud tüved. Ka võib siin tegemist olla bakterite parema kohanemusega liblikõielistega.

Järelikult on väga oluline saada ülevaade, millistel liblikõielistel esineb mügarbaktereid, ning anda viimaste bioloogiline, füsioloogiline ja biokeemiline iseloomustus. Ühtlasi on vaja selgitada taimede vastuvõtlikkus mügarbakterite infektsioonile.

Lisaks eelöeldule tuleb märkida, et andmed mügarbakterite esinemise kohta Eesti NSV-s kasvavatel liblikõielistel, mis seni ei ole pakkunud agronoomilist huvi, puudusid kuni antud töö alustamiseni. Sama kehtib ka mujal Nõukogude Liidus metsikult kasvavate liblikõieliste kohta.

Arvestades eelöeldut püstitati käesolevas töös järgmised põhiülesanded:

1) uurida mügarate esinemist ja morfoloogiat Eestis kasvavatel liblikõielistel ning selgitada seosed mügarate morfoloogiliste tunnuste, liblikõieliste taimede ja mulla omaduste vahel;

2) uurida mügaratest eraldatud *Rhizobium*'i puhaskultuuride morfoloogilisi, biokeemilisi ja kultuurilisi omadusi;

3) selgitada *Rhizobium*'i tuntud liikide ja esmakordselt väljaeraldatud tüvede infektsioossust mitmesuguste liblikõieliste taimeliikidele.

Uurimistel peeti silmas *Rhizobium*'i süstemaatika aluseid, et võimaluse korral teha mõningaid täiendusi seni kehtivas klassifikatsioonis.

Töö on tehtud Eesti NSV TA Eksperimentaalbioloogia Instituudis aastail 1963—1965 bioloogiadoktor Paul Rahno juhendamisel.

I. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. LIBLIKÕIELISTE TAIMEDE JA NENDEL ESINEVATE MÜGARATE ISELOOMUSTUS

Liblikõielised *(Leguminosae)* kui üks suuremaid taimede sugukondi on liikide arvult teisel kohal korvõieliste *(Compositae)* ja majanduslikult tähtsuselt teisel kohal kõrreliste *(Gramineae)* järel. Liblikõieliste sugukonna ulatus ei ole täpselt teada. Hinnangud kõiguvad 500—550 perekonnast ja 12 000—13 000 liigist kuni 700 perekonna ja 14 000 liigini. Selle sugukonna suurepärane ülevaade on toodud Norrise (1956), Tutini (1958) ning E. ja O. Alleni (1961) töödes. Nende autorite andmetel kuulub kaunaliselaadsete *(Leguminosales)* seltsi ainult üks sugukond — *Leguminosae*, mis jaguneb neljaks alamsugukonnaks: *Mimosoideae, Cesalpinioideae, Swartzioideae* ja *Papilionoideae*. Selline jaotus ei ole kooskõlas Eesti NSV flooras (Talts, 1959) toodud andmetega, mille järgi selts *Leguminosales* jaguneb kolmeks sugukonnaks: *Mimosaceae, Cesalpiniaceae* ja *Papilionaceae*. Käesoleva töö taksonoomilises osas järgime liblikõieliste jaotusskeemi, mille on andnud Tutin (1958), kuna kõik mügarbaktereid uurinud mikrobioloogid on lähtunud just sellest taimede jaotusest.

Alamsugukond *Mimosoideae*

Alamsugukonda *Mimosoideae* kuulub 6 triibust 40 perekonnaga, mis sisaldavad umbes 1500 liiki. *Mimosoideae* liigid, enamasti puud, põõsad ja liaanid, esinevad peamiselt troopilistel ja subtroopilistel aladel. Eriti rikkalikult on neid troopika ürgmetsades, kus nende arv sageli ületab teiste õistaimede liikide arvu. Erandi moodustab perekond *Acacia* 550 liigiga, millest üle 300 liigi on kohanenud Austraalia parasvööndi kliimaga. Euroopa flooras alamsugukonna *Mimosoideae* esindajad puuduvad.

Tutin (1958) peab seda alamsugukonda kromosoomide arvult kõige ühtlasemaks. Evolutsioonilise arengu seisukohalt aga peetakse *Mimosoi-*

deae'd kõige primitiivsemaks ja morfoloogiliselt kõige vähem spetsialiseerunud alamsugukonnaks liblikõieliste hulgas.

Viis perekonda — *Inga, Pithecolobium, Calliandra, Acacia* ja *Mimosa* — evivad igaüks üle 100 liigi. Ülejäänud perekondades on liblikõieliste liikide arv väiksem.

Mimosoideae lehed on enamasti paarissulgjad. Esinevad abilehed. Mõnel juhul on abilehed muundunud asteldeks. Õied on tavaliselt väikesed ja alati aktinomorfsed, välja arvatud perekonnad *Parkia* ja *Pentaclethera*. Arvukate tolmukate esinemist koos pikkade vabade tolmukaniitidega peetakse õie kõige iseloomulikumaks tunnuseks. Kroonlehed on harilikult kitsad ja mõnikord ühinenud all putkeks. Leiduvad ka kõlutolmukad (staminoodid). Sigimik on ülemine, ühepesaline, moodustunud ühest, harva rohkemast viljalehest. Esinevad paisk- kuni mitteavanevad viljad. Seemned on suured, vähese endospermiga või hoopis ilma endospermita.

Mügaraid on uuritud 146 liigil 21 perekonnast. Nendest leidus mügaraid 127 liigil. 19 liiki 7 perekonnast, millel mügaraid ei leitud, jaotuvad kõigi 6 triibuse vahel.

103 mügaraid moodustavat liiki kuuluvad triibustesse *Ingeae* ja *Acacieae*. 86 liiki jaotuvad kahe perekonna — *Albizzia* (17) ja *Acacia* (69) vahel. Ülejäänud nelja triibuse liike ei ole põhjalikult uuritud (E. ja O. Allen, 1961).

Mügaraid moodustavaid liike on leitud perekondades *Albizzia, Entada, Enterolobium, Pithecolobium, Lysiloma, Leucaena, Samanea, Schrankia, Desmanthus, Neptunia, Dichrostachys, Piptadenia, Parkia* ja *Wallaceodendron*. Kuid kahjuks on kõikide nende perekondade puhul, välja arvatud *Albizzia*, uuritud ainult kuut või vähem liiki. Nii mügaraid moodustavaid kui ka mügaraid mittemoodustavaid liike on leitud perekondadest *Inga, Calliandra, Acacia, Mimosa* ja *Prosopis*. Kõige rohkem on uurijate tähelepanu pälvinud perekond *Acacia*, kus ainult 4 liigil 73-st liigist ei esinenud mügaraid. Martin (1948) leidis, et mügarad puuduvad *Acacia greggi*'l ja *A. suffrutescens*'il. Bonnier (1957) andmetel puuduvad mügarad *Acacia*'l (sektsioon: *pinnata*) ja *A. silvicola*'l.

Kahe perekonna — *Adenanthera* ja *Pentaclethera* liikidel mügarad puuduvad. O. ja E. Allen (1947) ei leidnud mügaraid sadadel *A. pavonina* taimedel, mida nad kasvatasid üle 15 aasta erinevatel pinnastel ja mida nad püüdsid nakatada mitmesuguste *Rhizobium*'i kultuuridega. Bañados ja Fernandez (1954) märgivad, et *A. intermedia*'l, mis kasvab Filipiinidel, ei ole mügaraid. Ka endises Belgia Kongos kasvanud *Pentaclethera macrophylla*'l puudusid mügarad (Bonnier, 1957). Teiselt poolt aga leidub nende sugulastaimedel samast *Parkieae* triibusest *Parkia javonica*'l, *P. africana*'l ja *P. biglandulosa*'l rikkalikult mügaraid (O. ja E. Allen, 1947).

Täiesti uurimata on 50 liiki perekondadest *Affonsea, Archidendron, Hansemannia* ja *Serianthus* (triibus *Ingeae*), *Xerocladia, Gagenbina, Tetrapleura, Newtonia* ja *Styphnodendron* (triibus *Adenanthereae*) ning *Xylia, Platymenia* ja *Elephantorrhiza* (triibus *Piptadenieae*) (E. ja O. Allen, 1961). Need liigid esinevad peamiselt raskesti ligipääsetavates Uus-Meremaa, Amasoonase, Polüneesia ja Aafrika piirkondades.

Alamsugukond *Caesalpinioideae*

Käesoleval ajal sisaldab *Caesalpinioideae* alamsugukond 7 triibust umbes 100 perekonna ja 1300 liigiga. Nimetatud alamsugukond on perekondade arvult kaks korda suurem kui *Mimosoideae* alamsugukond, kuid ainult kahel neist perekondadest — *Cassia*'l ja *Bauhinia*'l — on rohkem kui 100 liiki.

Triibust *Kramerieae* ei peeta viimasel ajal enam liblikõieliseks (Turner, 1958 — tsit. E. ja O. Allen, 1961) ning triibus *Tounateae* moodustab neljanda liblikõieliste alamsugukonna *Swartzioideae* (Corner, 1951 — tsit. Tutin, 1958). *Caesalpinioideae* perekonnad on liikide arvult väga erinevad. Umbes 30 perekonda on monotüübilised, 20 perekonda sisaldavad 2—3 liiki, perekondades *Cassia* on aga 400 liiki, *Bauhinia* 250 liiki, *Chamaecrista* 100 liiki ja *Caesalpinia* 60 liiki. Enamik nende perekondade esindajatest kasvavad niisketes troopilistes metsades. Ainult kolme triibuse — *Bauhinieae, Cassieae* ja *Eucaesalpinieae* liblikõielised kasvavad paraskliimavööndis. Nad on kas puud, põõsad, liaanid või rohttaimed.

Lehed on enamikul liikidel lihtsulgjad, harva kahelisulgjad ja evivad leherootsu kinnituskohas paksendi (Dormer, 1946). Õied on suured, silmapaistvalt värvikad, sügomorfsed või nõrgalt liblikjad. Kroonlehti on tavaliselt viis. Kroon- ja tupplehed on enamasti vabad. Tolmukate arv ulatub kümneni. Tolmukaniidid on vastupidi *Mimosoideae* liikidele lühikesed ja jäigad. Kaunad on suured ja puitunud ning avanevad nii mõhuõmbluse kui ka selle vastasküljel asetseva seljaõmbluse kohalt. Seemned on suured, endospermiga või ilma endospermita ja on sageli varustatud ebaseemnerüüga.

Mügarate esinemist on uuritud selles alamsugukonnas 40 perekonna 115 liigil. Mügaraid leiti ainult 26 liigil, millest 15 liiki kuuluvad nii paljudesse perekondadesse, et peaaegu kõik triibused on esindatud. Mügaraid ei leitud 82 liigil 27 perekonnast. 7 liigi — *Cassia didymobotrya, C. grandis, C. hirsuta, C. marylandica, C. obtusifolia, C. occidentalis* ja *C. tora* kohta on vasturääkivad andmed (E. ja O. Allen, 1961).

10 perekonda on esindatud ainult ühe mügaraid eviva liigiga: *Amherstia nobilis, Colvillea racemosa, Copaifera officinalis, Dimorphandra mora, Erythrophloeum guineense, Hardwickia pinnata, Hymenaea coubaril, Tra-*

chylobium verrucosum, Gossweilerodendron balsamiferum ja *Gilbertiodendron dewevrei.*

5 perekonda — *Brownea, Cercis, Dialum, Cassia* ja *Chamaecrista* — sisaldavad nii mügaratega kui ka mügarateta liike. *Cassia* perekond on sellise anomaalia parimaks näiteks. Nii on selle perekonna 5 liigil pidevalt mügaraid, 30 liigil aga neid ei ole.

Mügarad puudusid järgmiste perekondade liikidel: *Cynometra, Scorodophloeus, Sindora, Brachystegia, Schotia, Tamarindus, Pahudia, Berlinia, Bauhinia, Ceratonia, Gleditschia, Gymnocladus, Schizolobium, Parkinsonia, Haematoxylon, Delonix, Hoffmannseggia, Caesalpinia, Mezoneurum* ja *Peltophorum.*

Ülejäänud selle alamsugukonna 50 perekonnal on mügarate esinemine või mitteesinemine teadmata. See seletub asjaoluga, et enamik nendest on monotüübilised, mis kasvavad ligipääsmatutes isoleeritud piirkondades.

Alamsugukond *Swartzioideae*

Alamsugukonda *Swartzioideae* kuulub ainult üks triibus — *Tounateae* 9 perekonnaga. Liikide arvult (üle 100 liigi) on kõige suurem perekond *Swartzia.* Alamsugukond *Swartzioideae* on peaaegu täielikult esindatud ainult Lõuna-Ameerika troopilistel aladel.

Selle väikese alamsugukonna esindajatel on pungas jagunemata tupp, mis lahkneb õies 3—5 tiibjaks tuppleheks, ja arvukalt tolmukaid. Ta on paigutatud *Caesalpinioideae* ja *Papilionoideae* alamsugukonna vahele, kuigi tema tolmukad sarnanevad teatud määral *Mimosoideae* alamsugukonna tolmukatega.

Mügarate esinemist ei ole uuritud ühelgi liigil.

Alamsugukond *Papilionoideae*

Liikide arvult on *Papilionoideae* alamsugukond kaunaliselaadsete seltsis suurim, haarates 10 triibust 400—500 perekonna ja 8000—10 000 liigiga. Vähemalt 20 perekonda sisaldavad üle 100 liigi, kusjuures suurim perekond on *Astragalus*, millel on kaugelt üle 1000 liigi. Alamsugukonna rohtjad esindajad on kohanenud peamiselt parasvööndi tingimustele. Puud ja põõsad on levinud aga enamasti troopilistel ja subtroopilistel aladel. Perekonnad *Astragalus, Hedysarum, Oxytropis* ja *Trifolium* esinevad nii arktilises kui ka alpiinsetes piirkondades.

See on ainuke alamsugukond, mille esindajaid leidub Eestis. Eesti flooras on esindatud kuus triibust: *Genisteae, Trifoliae, Loteae, Galegeae, Hedysareae* ja *Vicieae.* Ülejäänud triibuste — *Sophoreae, Podalyrieae, Dalbergieae* ja *Phaseoleae* esindajaid Eesti flooras ei leidu, kuid mõningaid

neist kultiveeritakse meil dekoratiiv- või kõrge väärtusega köögiviljataimedena.

Evolutsioonilise kriteeriumi seisukohalt on *Papilionoideae* arenenuim alamsugukond, kusjuures nendest kõige hiljem on tekkinud parasvööndi rohttaimed. Kromosoomuurimiste põhjal on rohtjad esindajad tsütoloogiliselt kõige varieeruvamad. Üldiselt tuleb aga *Papilionoideae* liblikõielisi iseloomustada nii morfoloogiliselt kui ka biokeemiliselt energiliselt progresseeruva alamsugukonnana.

Lehed on selle alamsugukonna esindajatel kaheli- või kolmelisulgjad, harva lihtsad ja terved (näiteks perekond *Genista*). Õied on liblikjad ja alati ülemise kroonlehega, mis on külgmistest kroonlehtedest palju suurem. Kroonlehed on alusel pinnukeseks ahenenud. Tolmukaid on kümme. Tolmukaniidid on tavaliselt putkena kokku kasvanud. Erandi moodustavad triibuste *Sophoreae* ja *Podalyrieae* esindajad, millel tolmukaniidid on vabad või peaaegu vabad. Troopikas kasvavatel puudel ja põõsastel on suured viljad suurte seemnetega, kuna paljudel parasvööndi liblikõielistel on väikesed viljad suhteliselt suurte seemnetega. Kaunad avanevad enamasti kahe poolmena. Seemned on endospermita.

Alamsugukonna *Papilionoideae* esindajate laialdane levik, hea kättesaadavus ja majanduslik tähtsus on põhjustanud neil esinevate mügarate põhjalikku uurimist.

Andmed mügarate esinemise kohta on antud 1024 liigil (E. ja O. Allen, 1961), mis moodustab 80% kõigist mügarate suhtes uuritud taimedest. Nendest 959 liiki peetakse mügaraid moodustavateks vormideks, kusjuures on esindatud kõik 10 triibust. 182 uuritud perekonnast on leitud mügaraid moodustavaid liike 148. 56 mügaraid mittemoodustavat liiki kuuluvad 27 perekonda. Mügarateta 9 liiki kuuluvad järgmistesse perekondadesse: *Cladrastis, Adesmia, Benthamantha, Eysenhardisia, Dalhousia, Olneya* ja

Tabel 1

Mügarate esinemine liblikõielistel taimedel

Alamsugukonnad	Perekonnad		Liigid			
	üldarv	uuritud	üldarv	uuritud	mügaratega	mügarateta
Mimosoideae	40	21	1500	146	127	19
Caesalpinioideae	100	40	1300	115	26	82
Swartzioideae	7	—	80	—	—	—
Papilionoideae	400	182	10000	1024	959	65
Kokku	547	243	12880	1285	1112	166

Maackia (Martin, 1948). Perekonnad *Vicia, Astragalus, Desmodium, Crotalaria* ja *Trifolium* sisaldavad igaüks üle 50 mügaratega liigi.

Eespool toodud ülevaade mügarate esinemise kohta liblikõielistel taimedel on kokkuvõtlikult toodud tabelis 1.

2. MÜGARBAKTERITE ISELOOMUSTUS

Mügarate esinemist liblikõieliste taimede juurtel registreeris esimesena Malpighi 1687. aastal (Carroll, 1934). Ta pidas neid juurekasvudeks. XIX sajandi esimesel poolel pidasid ka botaanikud mügaraid patoloogilisteks nähtudeks. Kuid kõik põlluharijad olid ühisel seisukohal, et liblikõieliste (ristik, hernes, lupiin) kasvatamisel mullaviljakus tõuseb ilma põldu väetamata.

Esimese katse selle selgitamiseks korraldas prantslane Boussingault 1838. aastal. Ta kasvatas ristikut, hernest ja nisu mullaga täidetud nõudes ning tegi kindlaks, et lämmastikusisaldus taimede rohelises massis ja seemnetes vegetatsiooniperioodi lõpuks oli hernel ja ristikul palju suurem kui nisul ning ületas mullast ja veest saadava lämmastiku hulga. Sellest järeldas Boussingault, et liblikõielised taimed on võimelised kasutama õhulämmastikku. Järelduse kontrollimiseks kordas ta katset, seekord kuumutatud mullaga ja sai negatiivse tulemuse: liblikõielised ei sisaldanud lämmastikku rohkem kui nisu. Seepärast pidas ta esialgselt tehtud järeldust katsevea tulemuseks.

1866. aastal uuris mügaraid vene teadlane Voronin. Tal õnnestus tõestada, et mügarad sisaldavad suurel hulgal mikroorganisme — baktereid. Kuid ka Voronin pidas mügaraid haigusnähtudest tingitud ebanormaalseteks moodustisteks. Järgmised uurimused kuuluvad Frankile (1879), kes leidis mügaraid kõigil tervetel, hästi arenenud liblikõielistel. Ta näitas, et mulla steriliseerimisega võib mügarate moodustumist ära hoida. Lõplikult näitasid Hellriegel ja Wilfarth 1888. aastal, et mügaraid põhjustab liblikõieliste juurtel mingi väline (kõrvaline) infektsioon. Nad kontrollisid mügarate tähtsust liblikõieliste ja mitteliblikõieliste taimede kasvamisel madala lämmastikusisaldusega steriliseeritud mullal kuni taimede kasvu lakkamiseni. Seejärel lisasid nad mõned tilgad ekstrakti, mis oli valmistatud steriliseerimata mullast ja millel olid kasvanud mügaratega liblikõielised. Nüüd moodustusid ka katsetatavatel liblikõielistel mügarad ja nad hakkasid õitsema, mitteliblikõielised aga hävisid. Seega lahendasid Hellriegel ja Wilfarth probleemi, millele palju tähelepanu pöörasid Boussingault, Laws ja Gilbert, ning kinnitasid juba Vana-Rooma põlluharijate arvamust, et liblikõieliste kasvatamisega on võimalik suurendada muldade viljakust. Lõpliku ja vaieldamatu kinnituse arvamusele, et juuremügaraid moodustavad bakterid, andis hollandi bakterioloog Beijerinck. Ta eraldas

1888. aastal vastavad bakterid puhaskultuurina ja saavutas mügarate kunstliku moodustamise liblikõieliste taimede juurtel inokulatsiooni teel. Selle omaduse tõttu nimetatakse baktereid mügarbakteriteks. 1890. ja 1892. aastal tõestasid Schloesing ja Laurent, määrates rangelt kontrollitud tingimustes kvantitatiivselt lämmastikusisalduse seemnetes, mullas ning õhus, lämmastiku fikseerimise mügarbakterite poolt sümbioosis liblikõielistega.

Algul kanti mügarbakterid perekonda *Bacillus radicicola* (Beijerinck, 1888), hiljem perekonda *Bacterium radicicola* (Pražmovski, 1890) ja 1889. aastal Franki poolt perekonda *Rhizobium*. Perekond *Rhizobium* kuulub sugukonda *Pseudomonadaceae*, seltsi *Eubacteriales* ja klassi *Eubacteriae* (*Schizomycetes*). Nende bakterite väljaeraldamine puhaskultuurina mügaratest tegi võimalikuks uurida *Rhizobium*'i morfoloogilisi, füsioloogilisi ja biokeemilisi omadusi.

Morfoloogilised tunnused

Mügarbakterid on peenikesed, pisut kõverdunud, ümmarguste otstega pulgakesed, mille diameeter on 0,5—0,9 μm ja pikkus 1,2—3,0 μm (Bergey, 1957). Berjozova, Dorossinski (1961) ja Fjodorov (1963) annavad nende suuruseks vastavalt 0,5—1,0 μm ja 1,0—7,0 μm. Kõrvuti pulgakestega esineb ka kokikujulisi ja hargnevaid (bakteroidid) vorme. Olenevalt sellest, millises arengufaasis bakterid on, erineb nende kuju, suurus ja rakusisene struktuur.

Bewley ja Hutchinson (1920) näitasid, et mügarbakterid teevad läbi küllaltki keeruka arengutsükli. Noortes mügarates kujutavad need bakterid peenikesi liikuvaid pulgakesi. Mügara edasisel arenemisel kaotavad bakterid viburid, muutuvad liikumatuteks ja omandavad vöötatud pulgakeste kuju, muundudes hiljem bakteroidideks.

Petrosjan ja Mirzabekjan (1939), kes uurisid esparseti mügarbakterite morfoloogiat, tegid kindlaks, et peremeestaimede vegetatsiooniperioodi algul asuvad noortes mügarates bakterid peenikeste terakestena. Õitsemiseelses faasis moodustub mitmesuguse suurusega vöötatud kepikesi ja suurel hulgal bakteroide. Sügiseks muutuvad bakterid normaalseteks pulgakesteks. Samasugust arengutsüklit on täheldanud Petrosjan (1959) lutserni, ristiku ja aedoa mügarbakteritel.

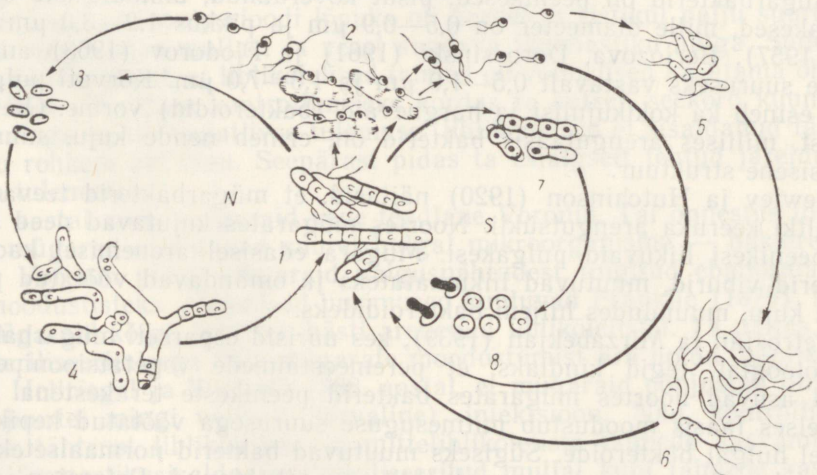
Thornton (1930) andis *Rhizobium*'i liikide täieliku arengutsükli kirjelduse (joonis 1). Seda on täiendanud Bisset (1952). Ta eristab kahte rühma mügarbaktereid: ühele rühmale on omane täielik arengutsükkel, teisele ainult osaline. Need bakterid, mis teevad läbi täieliku arengutsükli, on võimelised moodustama ka endospoore. Viimaste moodustumine on siiski vaieldav. Uurijad on enamasti seisukohal, et mügarbakterid ei ole võimelised moodustama spoore (Graham jt., 1963).

Bisset paigutab esimesse rühma täieliku arengutsükliga mügarbakterid, mis on isoleeritud metsikult kasvavatelt liblikõielistelt taimedelt. Osalise arengutsükli läbib aga enamik mügarbaktereid, mis on saadud põldudel kultiveeritud liblikõielistel. Et osa mügarbakterite arengutsüklist kulgeb mügaras ja osa mullas, siis püüab Bisset'i arengutsükli skeem kajastada neid mõlemaid astmeid (joonis 1).

Mügarbakterite kasvatamisel kunstlikel söötmetel kohtame kõige sagedamini pulga- ja kerakujulisi vorme.

Üks huvitavamaid astmeid mügarbakterite arengutsüklis on bakteroidide moodustumine, mida tunnustavad ja mida on kirjeldanud kõik uurijad. Käesoleva ajani ei ole aga selge, milliseid funktsioone nad mügarates täidavad. Nende funktsioonide kohta on kirjanduses väga erinevaid seisukohti.

Ühtede autorite arvates on bakteroidid involutsioonilised, patoloogilised, elujõuetud mügarbakteri vormid (Müller ja Stapp, 1925; Schaede,



Joonis 1. *Rhizobium*'i arengutsükli täielik tüüp. *N* — arenemine mügaras: väikesed bakterid arenevad hargnevateks mitmerakulisteks bakteroidideks. *S* — arenemine mullas: paljunemine võib toimuda endospooride tekkimise teel või vöötatud rakkude moodustumisega suurtest *Bacillus*'e-sarnastest pulgakestest. Vöötatud rakud muutuvad pulgakesteks, mis võivad tungida vastuvõtlike taimede juurekarvakestesse või kasvada suurte batsillide uueks põlvkonnaks, kas otseselt või *Bacterium*'i-sarnase põlvkonna kaudu. *1* — *Bacillius*'e-sarnased emarakud; *2* — vöötatud rakkude moodustumine; *3* — taimi infitseerivad rakud; *4* — bakteroidid; *5* ja *6* — *Bacterium*'i-sarnased liikuvad rakud; *7* ja *8* — spooride moodustumine. (Bisseti järgi, 1952.)

1932; Krassilnikov, 1949), teiste järgi aga võtavad nad osa õhulämmastiku sidumisest (Petrosjan, 1959; Jordan, 1962; Bergersen, 1966).

Uspenskaja (1953) on märganud seost herne mügarates leiduvate bakteroidide ja efektiivse lämmastiku fikseerimise vahel. Virtaneni arvates võib hernetaimedes leida bakteroidset kudet ainult efektiivsetes mügarates; mitteefektiivsetes mügarates võtavad bakterid limaga ümbritsetud kepikeste kuju. Autori arvates takistab bakterite ümber olev lima normaalset lämmastiku fikseerimist.

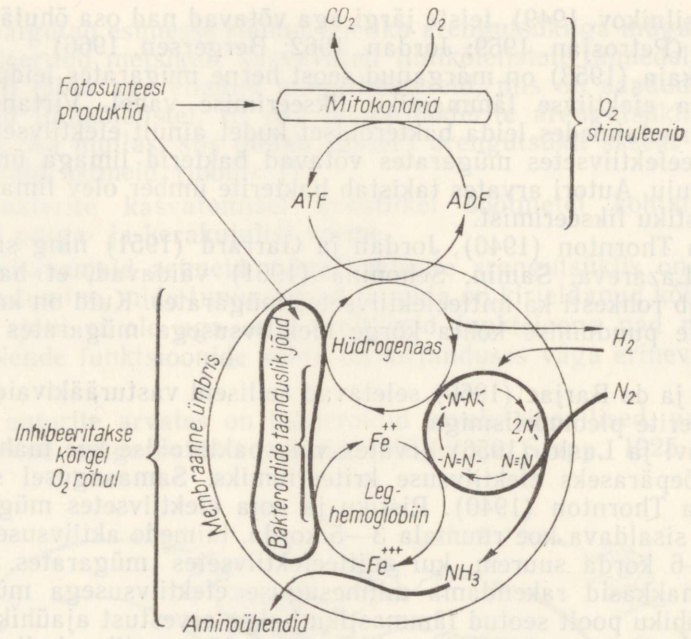
Chen ja Thornton (1940), Jordan ja Garrard (1951) ning samuti Dorossinski, Lazareva, Šamin, Šehonina (1961) väidavad, et bakteroidset kudet leidub rohkesti ka mitteefektiivsetes mügarates. Kuid on ka andmeid bakteroidide puudumise kohta kõrge efektiivsusega mügarates (Pfeiffer, 1928).

Pochon ja de Barjac (1960) seletavad selliseid vasturääkivaid andmeid mügarbakterite pleomorfismiga.

Fjodorovi ja Laslo (1956) arvates võib bakteroidse koe mahtu pidada küllaltki tõepäraseks efektiivsuse kriteeriumiks. Samasugusel seisukohal on Chen ja Thornton (1940). Ristiku ja soja efektiivsetes mügarates oli bakteroide sisaldava koe ruumala 3—5 korda, taimede aktiivsuse perioodil koguni 4—6 korda suurem kui mitteefektiivsetes mügarates. Chen ja Thornton hakkasid rakendama mitmesuguse efektiivsusega mügarbakterite massiühiku poolt seotud lämmastiku hulga arvestust ajaühiku jooksul. Mainitud uurijate andmetel on fikseeritud lämmastiku hulk võrdeline vd-ga (kus v on bakteroidse koe ruumala ja d — mügarate arv), mis on korrutatud veel ajaga t, mille jooksul seda ruumala mõõdeti.

Autorid, kes toetavad seisukohta, et rohke bakteroidse koe esinemine võib olla tüvede kõrge efektiivsuse kaudseks näitajaks (Chen ja Thornton, 1940; Smith, 1949; Jordan ja Garrard, 1951, Razumovskaja ja Vassiljeva, 1956; Nitse, 1958), märgivad samuti selle koe kestvamat funktsioneerimist nendes mügarates, mis moodustuvad efektiivsete tüvedega inokuleerimisel.

Erilist huvi pakub Bergerseni uurimus (1966), kus eksperimentaalsete faktide najal on antud skemaatiline mudel õhulämmastiku sidumise võimaliku mehhanismi kohta mügaras (joonis 2). Autori arvates on lämmastiku fikseerimise ühikuteks membraaniga ümbritsetud bakteroidid, mis saavad ATF-i peremeesraku perifeersetes osades rohkesti leiduvatest aktiivsetest mitokondritest. Mügarates leiduv leghemoglobiin on alati taandatud vormis (Fe^{++}). Kuna arvatakse, et kõikidest mügara komponentidest on ainult bakteroidid võimelised taandama leghemoglobiini, siis peab see olema kontaktis bakteroididega. Seega on kaks teadaolevat lämmastiku fikseerimise nõuet rahuldatud: 1) taime arvel — ATF osas ning 2) bakteroidide arvel — taandamisenergia osas. Ka hüdrogenaas on fikseeriva süsteemi lahutamatu osa.



Joonis 2. Õhulämmastiku sidumise skemaatiline mudel (Bergerseni järgi, 1966).

Viimaste aastate uurimustes näidatakse (Bergersen, 1966), et NH_3 on esmaseks stabiilseks vabalt esinevaks produktiks õhulämmastiku sidumisel. Teed N_2-st kuni NH_3-ni vaadeldakse taandusliku protsessina nii hemoglobiini kui ka hüdrogenaasi arvel, mis lülituvad taandusprotsessi eri etappidel. Kuid veenvad andmed lämmastikku siduvate fermentide asukoha kohta puuduvad. Soja katsetamisel N^{15} isotoobiga paistab fermentsüsteemi lokaliseerumine bakteroidis vähetõenäolisena: ta võib asetseda kas bakteroidi pinnal, teda ümbritsevas membraanis või membraanist seespool (Bergersen, 1966).

Kuigi viimastel aastatel on eespool nimetatud lämmastiku sidumise teooria leidnud rohkesti poolehoidjaid, esineb veel teisigi kontseptsioone, kus esmaseks produktiks lämmastiku sidumisel on hüdrasiinitüüpi ühend (Fjodorov, 1952; Thimann, 1965). Et N_2 on fikseeritav materjal, peab primaarne produkt sisaldama 2N. See seisukoht leiab kinnitust viimases teoorias, muutes selle usutavaks ja tõenäolisemaks kui teised lämmastiku sidumise teooriad. Tuleb ka märkida, et primaarse taandumisprotsessi käi-

gus ei ole tegev ferment hüdrogenaas, vaid nitrogenaas, mis Mo tõttu võimaldab efektiivsemat valentsivahetust.

Mullas vabalt elunevatel mügarbakteritel on viburitega varustatud pulgakeste kuju. Peškovi (1955) arvates algavad viburid tsütoplasmaatilisest membraanist. Ent viimaste aastate elektronmikroskoopilised uurimised (Pehhov, 1962) on kinnitanud teist arvamust: viburid saavad alguse tsütoplasmast ja väljuvad läbi rakuseina. Viburite kinnituskohaks tsütoplasmas on ligikaudu 40 nm diameetriga nn. basaalsed graanulid (van Itersen, 1953) (joonis 8).

Viburid sisaldavad 15,7—16,7% N, 0,05% P, 0,0001—0,2% sahhariide, 0,8% lipiide, 0,0006—0,1% nukleiinhappeid ning aminohappeid peale trüptofaani, histidiini, proliini ja oksüproliini (Weibull, 1960).

Viburid on väga õrnad bakteriraku komponendid ja murduvad kergesti mitmesuguste välistegurite mõjul. Nimetatud asjaolu ongi üks olulisi põhjusi, mis teeb bakterirakkude viburite uurimise raskeks.

Rhizobium'i morfoloogia uurijad jaotavad mügarbakterid viburite arvu ja asetuse järgi kaheks rühmaks: peritrihhid ja monotrihhid (Kellerman, 1912; Fred jt., 1918, Löhnis jt., 1921; Fred jt., 1932).

Mainitud autorid paigutasid esimesse rühma kõik kiiresti kasvavad tüved, mis olid isoleeritud lutsernilt, ristikult, mesikalt, vikilt, hernelt ja valgelt akaatsialt, aeglaselt kasvavatest mügarbakteritest aga ainult lupiinilt isoleeritud tüve. Teise rühma moodustasid kõik ülejäänud aeglaselt kasvavad tüved, mis olid isoleeritud *Vigna*'lt, *Soja*'lt ja maapähklilt.

Bushnell jt. (1937) paigutasid teise rühma, s. o. monotrihhide hulka, ka lupiinilt isoleeritud mügarbakteritüved.

Neisse viburite kohta käivatesse esimestesse uurimistesse tuleb suhtuda teatava ettevaatusega uurimismeetodite puudulikkuse tõttu. Usaldavaid tulemusi antud probleemi lahendamisel on võimaldanud saada alles viimastel aastakümnetel elektronmikroskoobi abil teostatud uurimised.

Conn ja Elrod (1947) leidsid, et herne ja ristiku baktertüved kuuluvad peritrihhide hulka, lutserni bakteritüved aga võivad olla nii peritrihhid kui ka monotrihhid. Nad jõudsid seisukohale, et mügarbakterite viburite iseloom ja tüüp ei ole diagnostilised tunnused.

Melkumova (1957) nentis, et lutserni mügarbakteritel on üks subpolaarselt kinnitunud vibur, s. t. nad kuuluvad monotrihhide hulka.

Leifson ja Erdman (1958) kasutasid katses 19 liblikõielise perekonna 35 liigilt isoleeritud 38 *Rhizobium*'i tüve. Nende andmetel on kiiresti kasvavate tüvede (peritrihhid) viburite paine pikkus 1,3—1,6 μm. Aeglaselt kasvavate tüvede (monotrihhide) viburite paine pikkus on 1,9—2,2 μm. Leifsoni ja Erdmani arvates on korrelatsioon viburite iseloomu ning bakterite kasvukiiruse vahel silmatorkav ja peaaegu perfektne.

Ley ja de Rassel (1965) jõudsid üldjoontes väga sarnastele seisukohtadele Leifsoni ja Erdmaniga (1958). Ka nende andmetel jagunevad

Rhizobium'i tüved kiiresti kasvavateks — peritrihhideks ja aeglaselt kasvavateks — monotrihhideks. Peale nende kahe hästi diferentseeritava tunnuse leidsid nad veel kolmanda tunnuse, milleks on bakteriraku DNH-s guaniini- ja tsütosiinisisaldus. Kõik kiiresti kasvavad tüved (peritrihhid) sisaldavad guaniini + tsütosiini 58,6—63,1%. Aeglaselt kasvavates bakterirakkudes (monotrihhid) on aga guaniini + tsütosiini 62,8—65,5%.

Huertos jt. (1955) leidsid lupiinil ainult ühe subpolaarselt kinnitunud viburi. Krassilnikov (1949) ja Bergey (1957) paigutavad lupiini bakteritüved peritrihhide hulka.

Ziegler (1956) märgib, et *Phaseolus vulgaris*'e bakterirakkude viburite läbimõõt on 10—15 nm ja neil on 2—5 painet, kusjuures keskmine paine pikkus on 2 μm.

Appleman jt. (1942) leidsid mügarbakteri viburitel valgusarnasest ainest detaile, mida ei varajasemas ega ka hilisemas kirjanduses pole kirjeldatud. Küll aga kirjeldasid Mudd ja Lackman (1941) sarnaseid viburite detaile füsobakteri tüvedel.

Nagu juba eespool mainisime, murduvad bakterite viburid väga kergesti. See seletabki kirjanduses toodud erinevaid seisukohti viburite iseloomu kohta mügarbakteritel. Põhjus, miks lutsernilt isoleeritud bakteritüvesid peetakse nii mono- kui ka peritrihhideks, võib olla just see, et osa vibureid on murdunud. Seepärast tuleb nõustuda Leifsoni ja Erdmani (1958) seisukohaga, kelle väidetel monotrihhideks võib pidada ainult neid bakterirakke, mille ainuke vibur on kinnitunud subpolaarselt. Kui aga vibur on kinnitunud bakteriraku teistesse kohtadesse, siis kuuluvad need bakterid peritrihhide hulka vaatamata sellele, et vibureid on ainult üks.

Füsioloogilised tunnused

Kasv želatiinis. Mitmed uurijad, nagu Beijerinck (1888), Hiltner (1900), Zipfel (1911), Wilson (1917), märgivad, et mügarbakterid ei ole võimelised veeldama želatiini. Fremlini (1898 — tsit. Fred jt., 1932) andmetel aga veeldavad lupiini mügarbakterid želatiini kiiresti.

Burrill ja Hansen (1917), kes uurisid põhjalikult suurt hulka mügarbakterikultuure, jõudsid järeldusele, et need organismid veeldavad želatiini väga aeglaselt. Mõningal määral sarnaseid andmeid on saanud ka Fred ja Davenport (1918).

Selle küsimuse üks põhjalikumaid uurimusi on Stappil (1924). Ta kasutas väga suurt hulka mügarbakterite tüvesid, mis esindasid peaaegu kõiki ristinokulatsioonirühmi, ja leidis, et nad eranditult kõik veeldavad aeglaselt želatiini.

Ka Walker (1928) uuris paljude bakterikultuuride želatiini veeldamise

võimet. Ta märkis, et želatiini veeldamiseks on tarvis pikka inkubatsiooniaega (3—4 kuud) ja neutraalset keskkonna reaktsiooni.

Müller ja Stapp (1925) märkisid, et želatiini olid võimelised veeldama bakterikultuurid, mida isoleeriti *Pisum*'ilt, *Vicia*'lt, *Phaseolus*'elt, *Melilotus*'elt, *Medicago*'lt ja *Trifolium*'ilt. *Soja*'lt ja *Lupinus*'elt eraldatud bakteritüved veeldasid želatiini väga nõrgalt või üldse mitte.

Viimastel aastakümnetel on kirjanduses ilmunud väga vähe andmeid želatiini veeldamise kohta ja needki vähesed tööd, mis on ilmunud sel alal, puudutavad nimetatud küsimust pealiskaudselt. Nii märkis Petrosjan (1959), et osa lutserni, ristiku, aedoa ja esparseti juuremügaratest eraldatud baktereid veeldas želatiini, osa aga mitte.

Smith'i (1958) väitel ei ole ükski *Rhizobium meliloti* ja *Rh. trifolii* tüvedest võimeline želatiini veeldama. *Rhizobium leguminosarum*'i, *Rh. phaseoli*, *Rh. lupini* ja *Rh. japonicum*'i tüvedest aga osa veeldab želatiini, osa mitte.

Jensen (1958) märgib, et enamik kiiresti kasvavatest mügarbakterite tüvedest veeldavad želatiini aeglaselt ja nõrgalt. Kuid ka nende hulgas võib leida tüvesid, mis ei veelda želatiini, vaatamata sellele, et nad on eraldatud ühelt ja samalt liblikõielise liigilt.

Kõik need tööd on põhiliselt konstateerinud mügarbakterite võimet veeldada või mitte veeldada želatiini kui lihtsat fakti, ilma et ükski autor oleks selgitanud nende erinevuste põhjusi.

Võib arvata, et põhjuseks, miks mõnede autorite andmetel ühtedelt ja samadelt peremeestaime liikidelt eraldatud tüved veeldasid želatiini, teiste autorite andmetel aga mitte, tuleb pidada nende tüvede geograafilist päritolu. Eriti ilmneb see Aafrikast ja Euroopast pärinevate ristikute liikidelt eraldatud mügarbakteritel, mis pole isegi võimelised üksteise peremeestaimi nakatama ja mügaraid moodustama. Järelikult peavad neil bakteritüvedel olema ka teistsugused füsioloogilised ja biokeemilised tunnused. Teiselt poolt tuleb põhjusi otsida ka uurimismeetodite erinevuses, sest küllaltki olulise tähtsusega on toitekeskkonna koostis, milles jälgiti želatiini veeldamist.

Kasv lakmuspiimas. Andmed mügarbakterite kasvu iseloomu kohta lakmuspiimas on peaaegu kõik pärit varajasematest töödest (Löhnis ja Hansen, 1921; Müller ja Stapp, 1925; Stevens, 1925; Hofer ja Baldwin, 1932; Bushnell jt., 1937).

Löhnis ja Hansen (1921) näitasid, et mügarbakterid jagunevad kasvu iseloomu järgi lakmuspiimas kaheks selgesti eristatavaks rühmaks. Esimesse rühma kuuluvad organismid lutsernilt, ristikult, mesikalt, hernelt ja aedoalt moodustavad «seerum»-tsooni. Teise rühma paigutasid autorid *Vigna*'lt, *Genista*'lt ja *Soja*'lt eraldatud tüved, mis lakmuspiimas «seerum»-tsooni ei moodustanud.

Müller ja Stapp (1925) paigutasid ka lupiini, seradella ja kirju sarikherne juuremügaratest isoleeritud bakterid teise rühma.

Stevens (1925) jaotas mügarbakterid nimetatud tunnuste põhjal kolme rühma:

I. «Seerum»-tsoon ja happeline keskkonna reaktsioon (*Medicago, Meliloti* mügarbakterid).

II. «Seerum»-tsoon ja aluseline keskkonna reaktsioon (*Pisum*'i, *Phaseolus vulgaris*'e, *Vicia* mügarbakterid).

III. «Seerum»-tsoon puudub, tugevalt aluseline keskkonna reaktsioon (*Vigna, Soja, Lupinus*'e mügarbakterid).

Peaaegu analoogilistele tulemustele jõudsid ka Bushnell jt. (1937), kes leidsid, et ainult *Medicago sativa* mügarbakterid annavad kestva happelise reaktsiooni lakmuspiimas. *Robinia* andis ajutise happelisuse, mis kiiresti muutus aluseliseks. Kõikide teiste perekondade tüved, vaatamata nende kuuluvusele eri ristinokulatsioonirühmadesse, moodustasid tugeva aluselise reaktsiooni kas koos «seerum»-tsooniga või ilma.

Hilisematest andmetest on teada vaid Megrabjani (1946, 1955) ja Petrosjani (1959) uurimiste tulemused lakmuspiima reaktsiooni muutuste kohta esparseti, viki ja ristiku mügarbakterite toimel. Saadud tulemuste põhjal teevad nad järelduse, et kõik vikilt isoleeritud tüved, osa ristiku ja osa esparseti tüvedest põhjustavad aluselise reaktsiooni. Teine osa esparseti ja ristiku bakteritüvedest aga muudavad lakmuspiima reaktsiooni happeliseks.

Esitatud materjal on kahtlemata liiga napp selleks, et saada küllaldast ülevaadet lakmuspiima reaktsiooni muutuste ning «seerum»-tsooni moodustamise kohta mügarbakterite poolt, seda enam, et osa tsiteeritud andmeid on autorid esitanud ainult täiendava lisamaterjalina muude vaatluste ja tähelepanekute illustreerimiseks.

Biokeemilised tunnused

Sahhariidide fermenteerimine. Mügarbakterid võivad konstitutiivsete ja adaptiivsete fermentide olemasolu tõttu kasutada energiaallikana väga paljusid süsinikühendeid, sealhulgas ka mitmealuselisi alkohole. Sahhariidide fermenteerimist *Rhizobium*'i tüvede poolt on uuritud 50 aasta jooksul (Zipfel, 1911; Müller ja Stapp, 1925; Baldwin ja Fred, 1927; Conklin, 1936; Georgi ja Ettinger, 1941; E. ja O. Allen, 1950; Manninger, 1962; Norris, 1965).

Zipfel (1911) kirjeldas hapete moodustumist glükoosi, laktoosi, galaktoosi ja manniidi fermenteerimisel mügarbakterite poolt.

Mülleri ja Stappi (1925) andmetel kasutab *Rhizobium* süsinikuallikana peale monosahhariidide ka di-, tri- ja polüsahhariide.

Baldwin ja Fred (1927) märkisid, et mügarbakterid võib sahhariidide fermenteerimise põhjal jaotada kahte suurde rühma. Esimese rühma moodustaksid lutserni, ristiku, herne ja aedoa bakterid, mis sahhariidide fermenteerimisel tekitavad happelise reaktsiooni. Teise rühma kuuluksid *Soja* ja *Vigna* juuremügaratest isoleeritud aluselist reaktsiooni tekitavad organismid. Seejuures fermenteeris *Rhizobium* heksoose ja pentoose paremini kui di- või trisahhariide. Smith (1958) uuris 20 eri süsivesiku fermenteerimist 50 mügarbakteri tüve poolt, mis haarasid kõiki *Rhizobium*'i liike. Tema andmetel ei moodustanud ükski katses olnud tüvi ühegi sahhariidi puhul aluselist reaktsiooni, kuigi paljudel juhtudel *Rhizobium japonicum*'i ja *Rh. lupini* tüvede korral jäi reaktsioon muutumatuks, s. t. neutraalseks. Conklini (1936), Georgi jt. (1941) arvates on kõige suurem happe produtseerimise võime *Rhizobium meliloti* hulka kuuluvatel tüvedel, teiste uurijate andmetel aga neil tüvedel, mille peremeestaimed kuuluvad *Loteae* või *Vicieae* triibustesse (E. ja O. Allen, 1950; Norris, 1965).

Erinevaid andmeid on toodud selle kohta, kuidas *Rhizobium*'i tüved kasutavad arabinoosi ja dultsitooli. Manningeri (1962) teateil ei lõhustanud neid ükski uuritud *Rhizobium*'i tüvi. Neal ja Walker (1935) ning Conklin (1936) on saanud vastupidiseid tulemusi.

Üks huvipakkuvamaid sahhariidide fermentatsiooni käsitlevaid töid on Norrise (1965) uurimus. Tema andmetel on sahhariidide fermenteerimine *Rhizobium*'i poolt seotud liblikõieliste taimede evolutsioonilise arenemisega. Need mügarbakterite tüved, mille peremeestaimed kuuluvad evolutsiooniliselt noorematesse triibustesse, on happemoodustajad, vastandina neile tüvedele, mis sahhariidide fermenteerimisel moodustavad aluselise reaktsiooni ja on isoleeritud kõige primitiivsematelt ning morfoloogiliselt kõige vähem spetsialiseerunud liblikõielistelt.

Georgi ja Wilsoni (1933) arvates muundavad *Rhizobium trifolii, Rh. leguminosarum* ja *Rh. meliloti* glükoosi fermenteerimisel 60—80% glükoosis sisalduvast süsinikust süsihappegaasiks, kuna ülejäänud süsinik läheb rakuainete sünteesiks ja limaainete moodustamiseks.

Kokku võttes võib öelda, et kuigi tähendatud uurimiste tulemused on mõneti vastuolulised, jääb domineerima seisukoht, et üks osa *Rhizobium*'i tüvedest on sahhariidide fermenteerimisel happemoodustajad, teine osa aga aluselise reaktsiooni tekitajad. Tundub aga tõenäolisena, et moodustuv aluseline reaktsioon on sekundaarse iseloomuga, s. t. võib olla põhjustatud näiteks söötmes sisalduvate lämmastikühendite lagundamisest või surnud rakumaterjali autolüüsist, mitte aga sahhariidide primaarsetest laguproduktidest.

3. MÜGARBAKTERITE KLASSIFIKATSIOON

Rhizobium'i liigilise klassifikatsiooni kohta on viimase poole sajandi jooksul ilmunud rohkesti töid (Simon, 1914; Garman ja Didlake, 1914; Fred jt., 1932; Krassilnikov, 1949; Allen ja Baldwin, 1954; Jensen, 1958; Smith, 1958; Manil, 1963; Graham, 1964).

Esimene ulatuslikum liblikõielistega sümbioosis elavate mikroorganismide klassifikatsioon kuulub Simonile (1914), kes jaotas mügarbakterid viide üsna piiritletud rühma. Autor viis läbi liblikõieliste seitsme perekonna 34 liigilt eraldatud tüvede ristinokulatsioonikatsed. Paljud tüved infitseerisid ainult oma peremeestaimi.

Garman ja Didlake (1914) tegid analoogilisi inokulatsioonikatseid, mille tulemusena nad said 6 rühma.

Burrill ja Hansen (1917) jaotasid mügarbakterid pärast liblikõieliste 9 perekonna 17 liigi põhjalikku uurimist 11 rühma, mille piirides peremeestaimed on vahetatavad. Erandi moodustas *Vigna sinensis*'e rühm.

Walkeri (1928) klassifikatsioon on põhilises osas kõige lähedasem tänapäeval kasutusel olevale Bergey (1957) klassifikatsioonile.

Oma klassikalises monograafias eristavad Fred, Baldwin, McCoy (1932) *Rhizobium*'i 6 liiki: *Rhizobium meliloti, Rh. trifolii, Rh. leguminosarum, Rh. phaseoli, Rh. lupini, Rh. japonicum.* Peale nende *Rhizobium*'i 6 liigi peremeestaimede käsitlevad nad veel 54 liblikõielist taime, kuid neil leiduvate mügarbakterite liigilise kuuluvuse jätavad autorid lahtiseks.

Selle viimase klassifikatsiooni võttis omaks ka Bergey (1957). Ta on iga mügarbakteri liigi kirjeldamisel püüdnud anda nende bakterite mõningaid morfoloogilisi, biokeemilisi ja kultuuritunnuseid. Vaatamata sellele on tema klassifikatsiooni aluseks *Rhizobium*'i liikide määramisel ainult ökoloogiline omadus (võime moodustada mügaraid teatud liblikõieliste juurtel).

Bergey väitel jagunevad liblikõieliste mügarbakterid järgmisteks liikideks:

1. *Rhizobium leguminosarum* — moodustab mügaraid *Pisum*'i, *Vicia*, *Lens*'i (*Cicer*), *Lathyrus*'e perekondadesse kuuluvatel liikidel.

2. *Rhizobium trifolii* — moodustab mügaraid kõikidel *Trifolium*'i liikidel ja *Medicago sativa*'l.

3. *Rhizobium phaseoli* — moodustab mügaraid *Phaseolus vulgaris*'el, *Phaseolus coccineus*'el ja *Phaseolus angustifolia*'l.

4. *Rhizobium meliloti* — tekitab mügaraid *Melilotus*'e, *Medicago* ja *Trigonella* perekondadesse kuuluvatel liikidel.

5. *Rhizobium japonicum* — moodustab mügaraid *Soja*'l.

6. *Rhizobium lupini* — moodustab mügaraid *Lupinus*'e ja *Ornithopus*'e perekonna liikidel.

Krassilnikovi (1949) määrajas on lisaks eelnimetatud 6 liigile toodud veel 3 liiki:

Rhizobium simplex — moodustab mügaraid *Onobrychis*'e perekonna liikidel.

Rhizobium pschati — moodustab mügaraid *Elaeagnus argentea* liigil.

Rhizobium ornithopi — moodustab mügaraid *Ornithopus sativus*'el.

Nimetatud autor annab ka 2 alamliiki: *Rhizobium acaciae* (*Rh. leguminosarum*'i alamliik), mis moodustab mügaraid *Acaciae* perekonna liikidel, ja *Rhizobium curvum* (*Rh. phaseoli* alamliik), mis moodustab mügaraid *Phaseolus panciflorus*'el.

Need kaks klassifikatsiooni on leidnud laialdast kasutamist, kusjuures vastuvõetavamaks tuleb pidada Bergey (1957) poolt antud klassifikatsiooni. Seda näiteks kas või sellepärast, et Krassilnikovi määrajas (1949) antud *Rhizobium*'i liik *Rhizobium pschati* on eraldatud mitteliblikõielise taime (*Elaeagnus*'e) juuremügaratest, kuigi traditsioon eeldab, et *Rhizobium*'i nime korral peab tegu olema bakteritega, mis elavad sümbioosis liblikõieliste taimedega.

Leifson ja Erdman (1958) jaotasid *Rhizobium*'i tüved morfoloogiliste tunnuste ja üldise kasvukiiruse põhjal kaheks üsna homogeenseks rühmaks. Kumbagi rühma võib lugeda iseseisvaks *Rhizobium*'i liigiks. Seega on perekonnal *Rhizobium* Leifsoni ja Erdmani väitel ainult kaks liiki, kusjuures kummalgi nendest võib edasi leida alajaotusi.

Viimase 20 aasta uurimised mügarbakterite nakatusvõime kindlakstegemiseks näitavad *Rhizobium*'i klassifitseerimisel kasutatavate liikide arvu vähenemise tendentse.

Wilson (1944) märkis, et mügarbakterite puhul on tegemist ainult ühe bakterite liigiga.

Smith (1958) uuris 50 erinevat mügarbakterite tüve, mis esindasid kõiki kuut *Rhizobium*'i liiki (Bergey andmetel), mitmesuguste meetoditega: erinevate suhkrute (pentooside, heksooside, disahhariidide, rafinoosi, alkoholide) kasutamine; tundlikkus pH suhtes; ureaasi produtseerimine; želatiini veeldamine; H_2S produtseerimine; metüülsinise redutseerimine; resistentsus 11 antibiootikumi suhtes. Autori arvates võib nende tunnuste alusel jaotada uuritud tüved kolme rühma: 1. *Rhizobium meliloti* tüved; 2. *Rhizobium trifolii, Rh. leguminosarum*'i *ja Rh. phaseoli* tüved; 3. mitmesugused tüved, kaasa arvatud *Rhizobium japonicum*'i, *Rh. lupini*, *Vigna sinensis*'e ja teiste troopilistele liikidele spetsiifilised tüved.

Manninger (1962) jaotas mügarbakterid, lähtudes nende võimest fermenteerida sahhariide, järgmisteks rühmadeks: *Rhizobium leguminosarum* A; *Rh. leguminosarum* B; *Rh. leguminosarum* C. Rühmad A, B ja C on eristatavad näiteks galaktoosi lagundamise põhjal. *Rhizobium leguminosarum* A ei lagunda galaktoosi, *Rh. leguminosarum* B moodustab hapet

ja gaasi, *Rh. leguminosarum* C aga ainult hapet. Autor on aga jätnud tähele panemata asjaolu, et sellist mügarbakterite tüvede käitumist võib jälgida ainult vedelsöötmel, kuna tardsöötmel gaasi moodustamise indikaator puudub.

Tešic ja Todorovitš (1963) jaotasid mügarbakterid viburite iseloomu alusel kaheks rühmaks: *Rhizobiomonas leguminosarum* ja *Rhizobacterium leguminosarum*. Esimene sisaldab 2 liiki (monotrihhid): *Rhizobiomonas leguminosarum f. sp. lupini* ja *Rhizobiomonas leguminosarum f. sp. japonicum*. Teine rühm sisaldab 4 liiki (peritrihhid): *Rhizobacterium leguminosarum f. sp. leguminosarum*; *Rh. leguminosarum f. sp. meliloti*; *Rh. leguminosarum f. sp. trifolii*; *Rh. leguminosarum f. sp. phaseoli*.

Ilmneb, et see jaotus on väga sarnane Bergey (1957) poolt antud mügarbakterite klassifikatsiooniga.

Graham (1964) uuris 100 mitmesugust tunnust 83 tüvel perekonnast *Rhizobium* ning 38 tüvel perekonnast *Agrobacterium*, *Chromobacterium*, *Beijerinckia* ja *Bacillus*. Tema uurimistulemuste järgi on tegemist nelja *Rhizobium*'i liigiga: 1. *Rhizobium trifolii*, *Rh. leguminosarum*, *Rh. phaseoli*; 2. *Rh. meliloti*; 3. *Rh. radiobacter* ja 4. *Phytomyxa japonicum*.

Ley jt. (1965) märgivad, et mügarbakterid jagunevad viburite iseloomu ja DNH aluste guaniini ja türosiini protsentuaalse sisalduse põhjal kaheks suureks rühmaks, kusjuures esimene rühm jaguneb veel kaheks alarühmaks: 1. *Rhizobium leguminosarum* ja 2. *Rh. meliloti*. Teise rühma kuulub ainult üks liik — *Rhizobium japonicum*.

Wagenbreth (1961), uurinud mitmete mügarbakterite rakkude DNH-sisaldust, eraldas samuti kaks mügarbakterite rühma: kiiresti kasvavad (*Rhizobium trifolii*, *Rh. leguminosarum*, *Rh. phaseoli* ja *Rh. meliloti*) ning aeglaselt kasvavad (*Rhizobium lupini*, *Rh. japonicum* ja *Lotus uliginosus*'elt eraldatud tüvi).

Viimastel aastakümnetel on püütud rakendada mügarbakterite liikide eristamiseks ka seroloogilisi teste. Huvitavaid tulemusi sel alal on saanud Kleczkowski ja Thornton (1944) ning Vincent (1954). Nende andmetel on bakterite rühmitus seroloogiliste tunnuste põhjal palju püsivam kui ühegi teise füsioloogilise omaduse järgi, sest bakterite seroloogilised tunnused ei muutu efektiivsuse või isegi mügardamisvõime kaotuse puhul.

«Rhizobiofaagi» kui taksonoomilise vahendi kasutamisel *Rhizobium*'i perekonna liikide määramiseks leidsid Roslycky jt. (1961), et paljude *Rhizobium meliloti* ja *Rh. trifolii* tüvede lüüsise kutsub esile ka üks *Agrobacterium radiobacter*'ilt eraldatud faag.

Rhizobium'i ja *Agrobacterium radiobacter*'i vaheline tõenäoline sugulus lubab oletada, et *Agrobacterium radiobacter* võis olla lähtevormiks, millest juureinfektsioonivõime omandamise teel arenes *Rhizobium*. Kuid võib ka arvata, et *Agrobacterium radiobacter* on *Rhizobium*, mis on kaotanud oma infektsioonivõime ja on kohanenud mittesümbiootiliseks eksisteerimiseks.

Meie poolt püstitatud hüpotees on väga lähedane Derxi (1953) oletusele, et *Rhizobium* võib olla arenenud organismidest, mis esialgu olid võimelised mittesümbiootiliseks lämmastiku sidumiseks ja mis võivad eksisteerida veel praegugi. Ta juhtis tähelepanu *Rhizobium*'i morfoloogilisele ja kultuurilisele sarnasusele perekonna *Beijerinckia*'ga, mille levikuala piirdub täielikult troopikaga. Autori arvates võib see piiratud levik olla tingitud mõningast seosest Beijerinckia ja troopiliste liblikõieliste vahel. Oletus, et Beijerinckia on andnud aluse *Rhizobium*'i arengule juure infitseerimise võime omandamise ja *in vitro* lämmastikusidumise võime kaotamise teel, jääb huvitavaks hüpoteesiks.

Võib-olla aitab bakterite geenide rekombinatsioonide uurimine lahendada püstitatud oletused.

Van Niel (1946 — tsit. Jensen, 1958) on läinud isegi nii kaugele, et tegi ettepaneku likvideerida kasutatav bakterite binaarne nomenklatuur ja asendada see omaduste erinevustele rajatud numbrilise süsteemiga.

Kirjanduse andmetest selgub, et kuigi enamik eespool nimetatud autoritest on andnud perekonnale *Rhizobium* väga lihtsa definitsiooni — bakterid, mis sümbiootiliselt asustavad liblikõieliste taimede juuremügarate kudet, võimaldades neil siduda õhulämmastikku —, pole mügarbakterite klassifitseerimise probleem hoopiski lahendatud. Kõigepealt ei piirdu *Rhizobium*'i elu ainult mügaratega, vaid enamiku oma aktiivsest elust veedavad nad teistes biotoopides: mullas ja taimede (mitte üksnes liblikõieliste) risosfääris. Näiteks leidis Rovira (1955) ristiku mügarbaktereid mittelibliköielise *Paspalum tuberosum*'i risosfäärist.

Seepärast ei ole päris õige kasutada biotoopi taksonoomilise tunnusena. Vastasel korral ei saaks mügaraid mittemoodustavaid bakteritüvesid arvata *Rhizobium*'i hulka, kuigi neil on kõik nende morfoloogilised, biokeemilised ja füsioloogilised tunnused. Arvatakse isegi, et liblikõieliste taimede asustamine *Rhizobium*'i poolt on mittespetsiifiline (Rippel-Baldes, 1952; Jakob, 1953). Asja teeb keeruliseks veel see, et mügarate moodustamise võime on omadus, mida bakterid võivad kaotada (ja ka omandada), kui neid kasvatada *in vitro*.

Samuti on teada, et mügarbakterite nakatusvõime võib oleneda peremeestaime geneetilistest omadustest. Nutman (1956) ja Aughtry (1948) märkisid, et retsessiivsed geenid põhjustavad liblikõieliste peremeestaimedel võime avaldada vastupanu juureinfektsioonile. Meie arvates tuleb selles otsida põhjust, miks paljudel liblikõielistel ei ole looduslikes tingimustes kunagi mügaraid ja miks mõningaid liblikõieliste liike (näiteks *Medicago lacinata*) on erakordselt raske infitseerida.

Ei saa jätta märkimata ka seda, et vaatlusi on teostatud liiga väheste bakteritüvede juures ja et uurimismeetodid on olnud liiga erinevad. Põhiliselt jäetakse kõrvale *Rhizobium*'i nende tüvede uurimine, mis ei paku agronoomilist huvi.

Esitatust nähtub, et kaugeltki mitte kõik liblikõielised pole läbi uuritud sümbioosi suhtes bakteritega. On reaalsed võimalused eraldada siin ja seal mullast mügarbaktereid, mille võimalikud peremeestaimed on tundmatud ja mida selletõttu ei saa sellistena liigitada.

Peame õigeks küsimust, mille püstitasid juba 1954. aastal O. Allen ja Baldwin: «Kas nakatusvõime peab tõepoolest jääma põhitunnuseks *Rhizobium*'i liigitamisel ja kas selleks ei tuleks kasutada teisi meetodeid (erinevate söötmete kasutamist, biokeemiliste omaduste uurimist, tundlikkust antibiootikumide suhtes, faagide mõju, seroloogilisi teste jne.).

4. MÜGARBAKTERITE LEVIKUT MÕJUSTAVAD TEGURID

On hästi teada, et mullas valitsevad tingimused avaldavad väga suurt mõju selles sisalduvatele mikroorganismide arvukusele ja nende liigilisele koostisele. Seejuures sõltub mikroorganismide koosluste formeerumise iseloom mullas mitte üksikutest mulla omadustest eraldi võetuna, vaid ühtsest keerukast faktorite kompleksist.

Uurimised on näidanud, et mitmesugused mulla omadused avaldavad mikroorganismide arengule erineva tugevusega toimet: ühed neist mõjustavad mikroorganismide arengut võrdlemisi tugevasti, teised aga suhteliselt nõrgalt. Seejuures võib ühe ja sama mulla omaduste toimes erinevatele mikroorganismidele täheldada suuri erinevusi (Mišustin, 1956; Krassilnikov, 1958; Pochon ja de Barjac, 1960).

Mügarbakterite esinemine muldades

Mügarbakterite levikumäära muldades võib kindlaks teha eelkõige vastavate liblikõieliste taimede esinemise järgi antud pinnasel. Vastavate peremeestaimede puudumisel jäävad mügarbakterid ilma nendest soodsatest kasvutingimustest, mida võimaldab neile sümbioos liblikõielisega.

NSV Liidus on mügarbakterite levikut käsitlevaid uurimusi väga vähe. Üks ulatuslikumaid uurimusi mügarbakterite leviku kohta Armeenia NSV muldades on Petrosjanilt (1959). Läti NSV-s on mügarbakterite levikut muldades uurinud Kalninš jt., (1962). Andmed mügarbakterite leviku kohta Eesti NSV muldades aga puuduvad täielikult.

Kalninš (1959) märkis ristiku mügarbakterite arvukat esinemist kõigis Läti NSV tugevasti kultuuristatud muldades ning osaliselt ka niidu- ja jäätmaamuldades. Seejuures leidus kõige rohkem baktereid miljoneid rakke 1 g mullas tüüpilistes ja leostunud kamar-karbonaatmuldades ning kultuuristatud kamar-leetmuldades, kõige vähem aga (10 000 rakku 1 g mullas) hapudes mittekultuuristatud tugevasti leetunud kamar-leetmuldades.

Melkumova (1961) leidis mügarbaktereid niidu-hallmuldades, alluviaalsetes hallmuldades ning hele-kastanmuldades, kusjuures kõige rikkalikumat (2000 rakku 1 g mullas) mügarbakterite esinemist fikseeriti niiduhallmuldades. Seevastu aga alluviaalsetes hallmuldades neid ei leidunud.

Petrosjan (1959), uurides ristiku, esparseti, lutserni ja aedoa mügarbakterite levikut mitmesugustes muldades, leidis *Rhizobium*'i kõigist mullatüüpidest. Kõige rohkem leidus neid Armeenia NSV kultuuristatud niisutatud karbonaatsetes pruunmuldades, tunduvalt vähem aga niisutamata muldades.

Krassilnikov (1947), uurides mügarbakterite sõltuvust mulla kultuuristatuse astmest, leidis, et Moskva oblasti kultuuristatud mullas on neid 10 000 rakku 1 g mullas, kultuuristamata muldades aga 10 korda vähem.

Uurijad on konstateerinud mügarbakterite massilist esinemist muldade kõige ülemises kihis (0—20 cm sügavuseni) ja liblikõieliste taimede risosfääris (Klincare, 1959; Rovira, 1961; Tuzimura ja Watanabe, 1961; 1962; Kalninš, 1962). Nii näiteks levib Kalninši (1962) andmeil *Rhizobium trifolii* niidu-kamar-gleimuldade profiilis 10 cm sügavuseni, kultuuristatud turvasmuldades ja kamar-leetmuldades aga 20 cm sügavuseni.

Mügarbakterite arvukus muldades allub sesoonsetele muutustele. Kõige rohkem leidub baktereid kevadel ja sügisel, kõige vähem aga suvel. Kalninši jt. (1962) ja Melkumova (1961) arvates on see nähtus tingitud muutustest mulla niiskuses.

Nagu esitatud materjalidest selgub, on *Rhizobium*'i ökoloogiat puudutatud võrdlemisi vähestes töödes, mistõttu seda küsimust ei saa kaugeltki lahendatuks pidada. Nähtavasti on seda tinginud asjaolu, et mügarbakterid asustavad teatava aja mügaraid liblikõieliste juurtel ning seepärast on uuritud mullaomaduste mõju peamiselt bakterite ja peremeestaime sümbioosile.

Järgnevalt annamegi lühikokkuvõtte kirjanduses ilmunud andmetest *Rhizobium*'i kasvu ja arengut mõjustavatest faktoritest.

Füüsikalised ja keemilised faktorid

Mulla niiskus ja temperatuur. Kuigi Omeljanski (1926), Fred jt. (1932) ning Izrailski (1951) tõestasid mügarbakterite suurt vastupidavust kauaaegsele niiskusedefitsiidile, on need paljude uurijate arvates sellised mikroorganismid, mis vajavad normaalseks arenemiseks mullas mõnevõrra suuremat veesisaldust kui teised mullamikroorganismid.

Nii hakkavad mügarbakterid arenema ainult siis, kui mulla niiskusesisaldus on vähemalt 16% täielikust veemahutavusest (Fjodorov ja Podjapolskaja, 1951). Optimaalseks niiskusesisalduseks *Rhizobium*'ile loetakse 60—80% mulla täielikust veemahutavusest (Timurdži, 1940; Petrosjan,

1952, 1959; Ukrainski, 1954). Kuivas mullas mügarbakterid osaliselt hävivad. *Rhizobium*'i vastupidavus niiskusedefitsiidile mullas sõltub bakteri liigist ja mullatüübist: savimullas on mügarbakterid kuivamisele vastupidavamad kui liivmuldades ja lupiini bakterid on ristiku bakteritest vastupidavamad (Kovrovtseva, 1931).

Ebaselgeks on jäänud, kui oluliselt toimub *Rhizobium*'i arvu vähenemine optimaalsetest piiridest kõrgema ja madalama mullaniiskuse puhul.

Mulla temperatuuri on *Rhizobium*'i arenemisel enamasti loetud suure tähtsusega faktoriks. Nii pidas Fjodorov (1959) mügarbakteritele sobivaimaks temperatuuri, mis on kõige parem ka liblikõieliste taimede endi arenemiseks. Näiteks leidis ta, et *Rhizobium*'i sisaldus mullas on kõige kõrgem 36° C puhul. Ka lutsern, ristik ja soja kasvasid selle temperatuuri korral kõige paremini.

Krassilnikov ja Korenjako (1946) aga konstateerisid, et temperatuur üle 26° C mõjub negatiivselt *Rhizobium*'i sisaldusele mullas.

Vartiovaara (1937), uurides madalate temperatuuride mõju mügarbakterite arenemisele, mis olid eraldatud eri maade (praeguse Araabia ÜV, Jugoslaavia, Soome ja Rootsi) muldadest, märkis *Rhizobium*'i teatavat adaptatsiooni klimaatilistele tingimustele. Tema andmetel on Põhja-Euroopa muldadest eraldatud mügarbakterite tüved madalatele temperatuuridele palju vastupidavamad kui pehme kliimaga maades isoleeritud tüved.

Wilsoni (1930) andmetel sõltub mügarbakterite sisaldus mullas aastaaegadest. Talvel madalate temperatuuride puhul on mügarbakterite hulk märgatavalt väiksem kui teistel aastaaegadel.

Mitmete uurijate (Allison ja Minor, 1940; Timurdži, 1940; Butkevitš, 1942; Fjodorov, 1952; Petrosjan, 1959; Gibbson, 1963) arvates tuleb *Rhizobium*'ile optimaalseks pidada temperatuuri 20—25° C; ainult mõnele *Rhizobium*'i liigile (*Rh. phaseoli, Rh. trifolii, Rh. japonicum*) on optimaalseks 29—31° C. Joffe, Weyer, Saubert (1961) ja Pate (1961) loevad *Rhizobium*'ile optimaalseks temperatuuriks 24° C. Selle temperatuuri puhul seovad mügarbakterite tüved sümbioosis liblikõielistega kõige paremini õhulämmastikku. Tuleb märkida, et ka liblikõieliste taimede endi arenemiseks peetakse 24° C temperatuuri kõige paremaks (Stalder, 1952).

Maksimaalseks temperatuuriks mügarbakteritele loetakse 50—60° C (Petrosjan, 1959).

Tuginedes palju aastaid kestnud uurimistele märgivad Izrailski jt. (1933), Dorossinski ja Lampovštšikov (1948) ning Gukova (1963), et kõrgemad temperatuurid mõjutavad *Rhizobium*'i arvukust mullas rohkem kui madalad. Tehti isegi kindlaks, et külmutamine stimuleerib mügarbakterite kasvu ja aktiivsust.

Fredi ja Frazieri (1920) ning Wassi (1919) andmeil on mügarbakterid

madalate temperatuuride suhtes küllalt vastupidavad ja see võimaldab nitragiini transportida ka talvel.

Vähe on andmeid selle kohta, millist toimet avaldavad *Rhizobium*'i arengule mulla lõimis, kultuuristatuse aste, õhustamistingimused jne.

Mulla reaktsioon (pH). *Rhizobium*'i arenemise sõltuvust mulla reaktsioonist täheldati juba esimestel aastatel pärast mügarbakterite esmakordset väljaeraldamist.

Fred ja Davenport (1918) leidsid, et sõltuvalt *Rhizobium*'i tundlikkusest mulla pH suhtes, reastuvad tüved järgmiselt: *Rh. meliloti, Rh. leguminosarum, Rh. trifolii, Rh. japonicum, Rh. lupini.*

Nimetatud seisukoht leidis kinnitust paljudes hilisemates uurimustes. Mõningaid lahkarvamusi tekkis siiski *Rhizobium*'i liikide arenemiseks minimaalse pH väärtuse määratlemisel, sest leiti, et *Rhizobium*'i liikide seas võib olla tüvesid, mille tundlikkus mulla reaktsiooni suhtes erineb. Näiteks Wright (1925), uurides soja mügarbaktereid, leidis nende hulgas tüvesid, mis kasvasid isegi pH 4,2 puhul. Stevens (1925) aga luges *Rh. japonicum*'ile minimaalseks pH väärtuseks 4,6.

Jensen (1948) kasvatas 24 *Rhizobium meliloti* ja *Rhizobium trifolii* tüve erineva pH-ga keskkondades ning jõudis järeldusele, et ühele osale *Rh. meliloti* tüvedest on minimaalseks mulla reaktsiooniks pH 5,4, teisele osale aga pH 6,4. 24-st *Rh. trifolii* tüvest kasvasid 10 hästi veel pH 5,2 korral, nende kasv lakkas aga pH 5,0 puhul. Ülejäänud 14 tüve puhul oli vastavateks pH väärtusteks 5,4 ja 5,2.

Optimaalseks pH-ks *Rhizobium*'i liikidele peavad mitmed uurijad 6,5—7,2 (Fred jt., 1932; Lampovštšikov, 1948; Petrosjan, 1959).

Wilson (1930) jõudis järeldusele, et *Rhizobium*'i sisaldus kõigub 50—1 000 000 rakuni ühes grammis mullas. Kõige väiksem oli bakterirakkude sisaldus muldades pH 5,4 puhul.

Jensen (1948) nentis maksimaalset *Rhizobium*'i rakkude hulka pH 6,8—7,0 korral ja Cabezas de Herrera (1956) sellest veelgi madalama reaktsiooni puhul (pH 6,5).

Ka kõrge pH pidurdab *Rhizobium*'i arenemist. Mulla pH 8,0 korral mügarbakterid enam ei paljunenud ja pH 8,5—9,0 puhul nende kasv lakkas (Mulder jt., 1966).

E. ja O. Alleni (1950) andmetel saab kontrollida mügarbakterikultuuri puhtust *Agrobacterium*'i suhtes nende kasvatamisega söötmel, mille pH on 11,0—12,0. Kriteeriumiks on bakterite kasvu puudumine antud söötmel.

Jenseni (1948) andmetel väheneb *Medicago sativa* ja *Trifolium subterraneum*'i lämmastiku fikseerimise võime järsult pH 5,0 puhul ja alla selle.

Virtanen (1928) leidis, et ristiku ja herne mügarbakterid kasvavad mullas pH 4,0 puhul, kuid ei suuda siduda õhulämmastikku, kui pH on alla 5,0. Bonnier (1960) märkis, et mügarate mittemoodustumine troopi-

kas kunstliku inokulatsiooni juhtudel on tingitud mulla kõrgest happesusest (pH 4,0—4,5).

Madalaimaks mulla pH piiriks, mille puhul mügarbakterid hävivad, on 3,2—5,0 (4,9—5,1 *Rh. meliloti*'l, 4,5—4,9 *Rh. trifolii*'l, 4,7 *Rh. leguminosarum*'il, 4,2 *Rh. japonicum*'il, 3,2 *Rh. lupini*'l) (Bryan, 1923). Bryan märkis veel, et maksimaalne arv mügaraid moodustub lutserni ja ristiku juurtel neutraalsele lähedases keskkonnas. Tema katses oli keskkonna pH 4,0—10,0.

Eespool toodud uurimisandmed näitavad väga tihedat seost ühelt poolt mulla reaktsiooni ja teiselt poolt *Rhizobium*'i rakkude arvu, morfoloogiliste tunnuste, mügarate moodustumise ning õhulämmastiku sidumise võime vahel.

Osa uurijaist on jõudnud seisukohale, et keskkonna reaktsiooni ja mügarbakterite õhulämmastiku sidumise võime seose iseloomule avaldavad mõju ka mitmesugused teised faktorid.

Jensen (1943 — tsit. Pochon ja de Barjac, 1960) märkis, et kuigi õhulämmastiku sidumine on pöördvõrdeline vesinikioonide kontsentratsiooniga mullas, võivad varem moodustunud mügarad fikseerida lämmastikku ka nende pH piiride puhul, mis takistavad uute mügarate moodustumist.

Samasugusel seisukohal on ka Pochon ja de Barjac (1960), kelle väidetel pH võrdub mügara sees keskmiselt 5,9-ga ega sõltu ümbritseva keskkonna reaktsioonist.

Kokku võttes tuleb märkida, et mulla reaktsiooni ning *Rhizobium*'i leviku ja arenemise vahelised seosed on veel lõplikult lahendamata. Põhjusi, miks selles küsimuses kuni viimase ajani esitatakse diametraalselt vastukäivaid seisukohti, on nähtavasti mitu. Ühelt poolt võib võimalikuks pidada seda, et mõningad mügarbakterite tüved sümbioosis liblikõielistega on võimelised eritama ümbritsevasse keskkonda happeid või aluselisi ühendeid, reguleerides sel viisil keskkonna pH-d. Teiselt poolt võib arvata, et keskkonna madal pH ei mõjusta ainult mügarbakterite arengut ja kasvu, vaid avaldab mõju ka liblikõieliste taimede juurte välispinna rakkude arengule, mistõttu nakatumist ei toimu.

Toitumisfaktorid

Fosfor ja kaalium. Mulla fosfori- ja kaaliumisisaldusele kui *Rhizobium*'i arengut mõjustavatele faktoritele on kirjanduses võrdlemisi suurt tähelepanu pööratud.

Fosfori- ja kaaliumiühendite positiivne mõju seisneb eeskätt mügarbakterite tüvede aktiivsuse tõstmises ning samuti paremate toitumistingimuste loomises liblikõielistele taimedele, nagu seda on märkinud rida autoreid (Wilson, 1917; Nitšiporovitš ja Perevostšikova, 1929; Pistsov,

1929; Tsjurupa, 1936; Bernard, 1937; Diener, 1950). Nad arvavad üksmeelselt, et fosfori- ja kaaliumiühendite olemasolust mullas sõltub mügarate suurus ja arv liblikõieliste juurtel. Peale selle paralüseerivad need ühendid (eriti fosforiühendid) mineraalse lämmastiku suurte dooside negatiivse mõju *Rhizobium*'i õhulämmastiku sidumise võimele (Dintšev, 1961, b; Ratner, 1964).

Enamik autoreid on rõhutanud fosfori- ja kaaliumiühendite olulist osa *Rhizobium*'ile eelkõige õhulämmastiku fikseerimisel (Geltser, 1948; McLachlan jt., 1961; Sankaram jt., 1963; Zaremba ja Malinskaja, 1963; Vlamis jt., 1964; Lopuhhina, 1964).

Vlamis jt. (1964) leidsid, et mulla väetamisel fosforväetistega tõuseb *Rhizobium*'i tüvede virulentsus ja efektiivsus, mille tagajärjel mügarate arv liblikõieliste juurtel suureneb 1,5 korda, võrreldes väetamata variantidega.

Sankaram jt. (1963) märgivad, et õhulämmastiku sidumine *Rhizobium*'i poolt on kõige intensiivsem fosforiühendite kontsentratsiooni puhul 17,8 kg 1 ha kohta. Teiste dooside puhul täheldati mitteolulist valgusisalduse suurenemist taimedes.

Lopuhhina (1964) leidis, et herne mügarbakterid sümbioosis peremeestaimedega seovad lämmastikku kõige paremini siis, kui fosforiühendite sisaldus mullas on 62 mg 1 kg ja kaaliumiühendite sisaldus 78 mg 1 kg kohta. Kui fosfori- ja kaaliumisisaldus on väiksem, siis väheneb ka bakterite õhulämmastiku fikseerimise võime.

Ka Novotny-Mieczynska jt. (1959) konstateerisid, et kõige paremini seovad ristikult isoleeritud mügarbakterid õhulämmastikku siis, kui kaaliumisisaldus mullas on 75 mg/kg ja mineraalse lämmastiku sisaldus ei ületa 5 mg/kg.

Geltser (1948) peab õhulämmastiku fikseerimisele kõige soodsamaks kaaliumoksiidi ja fosforpentoksiidi sisaldust vahekorras 1 : 1,72. Kaaliumi hulga suurenemine fosfori suhtes viib õhulämmastiku sidumise võime vähenemisele.

Eespool mainitud autoritest vastupidisel seisukohal on Tevari (1963). Uurides mitmesuguste toiteelementide (P, Ca, B, Mo) mõju *Vigna* mügarbakteritele, konstateeris ta, et fosforiühendite kasutamine ei avaldanud positiivset mõju bakterirakkudele endile, peremeestaimedele ega ka õhulämmastiku sidumise võimele.

Dintšev (1961, a) märkis, et fosforiühendite viimisega mulda on võimalik tõsta *Rhizobium*'i virulentsust. Sellega seletab ta mügarate arvu suurenemist liblikõieliste juurtel.

Nagu selgub, puudub uurijail üksmeel *Rhizobium*'i õhulämmastiku sidumise võime ja mullas sisalduvate fosfori- ning kaaliumiühendite hulga vahelise seose olemasolu ja selle seose tugevuse kohta.

Praktiliselt pole uurijad esitanud andmeid ka selle kohta, kas fosfori-

ja kaaliumiühendite erineva kontsentratsiooni korral mullas täheldatakse *Rhizobium*'i arvukuses olulisi tõusu- või langustendentse ja millise kontsentratsiooni puhul need muutused toimuvad.

Kaltsium. *Rhizobium*'i leviku tihedat seost kaltsiumisisaldusega mullas konstateeriti juba esimestel aastatel pärast mügarbakterite esmakordset väljaeraldamist. Nii konstateerisid Fred jt. (1932) ning Albrecht (1937) kaltsiumiühendite suurt mõju mügarbakterite lämmastiku fikseerimise võimele sümbioosis liblikõielistega.

Happelist mullareaktsiooni ja mitteküllaldast kaltsiumisisaldust mullas loetakse peamisteks faktoriteks, mis mügarbakterite arenemist pidurdavad.

Mitmed autorid on leidnud, et mulla happesust, mis avaldab kahjulikku mõju *Rhizobium*'ile, on võimalik kõrvaldada mulla lupjamisega (Holding ja King, 1963; Radulovič, 1963; Tevari, 1963; Pacheco, 1964). Radulovič (1963) on seisukohal, et $CaCO_3$ viimine mulda stimuleerib nii spontaansete kui ka nitragiiniga mulda viidud mügarbakterite arenemist.

Holding jt. (1963) märkisid, et mulla kaltsiumisisalduse suurenemine tõstab kohalike *Rhizobium*'i tüvede efektiivsust. Näiteks suurenes valges ristikus kuivainesisaldus selle tõttu kolm korda.

Tevari (1963) leidis, et $CaCO_3$ dooside korral 560 kg/ha suurenes mügarate hulk taimede juurtel seoses mügarbakterite virulentsuse kasvuga.

Mišustini ja Bernardi (1935), Loneragani (1960) ning Andersoni jt. (1946) andmetel avaldab Ca positiivset mõju nii mügarate kasvule kui ka mügarbakterite lämmastiku sidumise võimele.

Erinevalt eespool nimetatud autoritest uuris Norris (1958) kaltsiumi mõju eri *Rhizobium*'i liikidele. Autor konstateeris, et kõige tundlikumad kaltsiumile on ristiku mügarbakterid, neile järgnevad *Rh. meliloti* ja *Rh. leguminosarum*'i bakterid. *Vigna* mügarbakterid ei reageerinud kaltsiumisisalduse muutustele. *Rh. japonicum*'i puhul aga täheldati kaltsiumisisalduse ning mügarbakterite virulentsuse ja lämmastiku sidumise võime vahel negatiivset seost. Albrecht (1937) sai positiivse efekti ka soja kasvatamisel rohke kaltsiumisisaldusega mullas võrdsete pH-de korral.

Van Schreven (1958) jõudis seisukohale, et kaltsiumi puudumine muldades ei limiteeri *Rhizobium*'i levikut, vaid selleks oluliseks toiteelemendiks on magneesium. Kaltsiumi positiivne toime on peale mulla happelise reaktsiooni kahjuliku mõju kõrvaldamise seotud ka kaltsiumi enda ioonide kasuliku mõjuga mügarbakteritele, mügarate moodustamisele ja lämmastiku sidumise võimele. Nii märkis Fjodorov (1952), et kaltsiumkarbonaadi asendamine naatriumkarbonaadiga muldade lupjamisel ei suurendanud mügarate hulka liblikõieliste juurtel.

Eeltoodust selgub, et kuigi enamik uurijaist tunnistab kaltsiumisisal-

duse positiivset mõju mügarbakterite virulentsusele ja lämmastiku sidumise võimele, esineb ometi ka andmeid selle kohta, et mügarbakterite areng ei sõltu mulla kaltsiumisisaldusest.

Mineraalne lämmastik. *Rhizobium*'i arvukusele ning õhulämmastiku sidumise võimele avaldab olulist mõju see, kas ja kui palju esineb nende bakterite elukeskkonnas mineraalseid lämmastikuühendeid.

Väga väikestes kogustes stimuleerivad mineraalsed lämmastiku ühendid mügarbakterite kasvu ja suurendavad nende õhulämmastiku sidumise efektiivsust sümbioosis liblikõielistega (Rudakov jt., 1936, Sornson, 1937; Juhimtšuk jt., 1937; Gussev, 1939; Butkevitš jt., 1941; Geltser, 1948; Fjodorov, 1952; Novotny-Mieczynska jt., 1959; Pate jt., 1961; Kalninš, 1963; Tanner jt., 1963).

Novotny-Mieczynska jt. (1959) andmetel soodustas õhulämmastiku sidumist *Rhizobium*'i poolt ammooniumlämmastiku manulus kontsentratsioonis 50 mg 10 kg mulla kohta. Kümme korda suurema lämmastikukoguse puhul oli mügarate arv liblikõieliste juurtel palju väiksem. Lopuhhina (1964) aga leidis, et mineraalse lämmastiku kontsentratsioonil 42 mg 1 kg mulla kohta sidusid mügarbakterid kõige intensiivsemalt õhulämmastikku. Kui samas koguses mullas esines mineraalseid lämmastikuühendeid aga 8 mg ja 126 mg, ei sidunud need bakterid õhulämmastikku. Sellist nähtust võib meie arvates seletada järgmiselt: mineraalse lämmastiku doos 8 mg oli liiga väikene liblikõieliste taimede esialgseks normaalseks arenemiseks ja mügarate moodustamiseks. Doosi 126 mg puhul aga asusid liblikõielised rikkaliku lämmastikuga keskkonnas ja hakkasid esmajärjekorras kasutama mineraalseid lämmastikuühendeid, mitte aga lämmastikku, mida nad oleksid võinud saada sümbioosis mügarbakteritega.

Arvatakse isegi, et mineraalse lämmastiku kõrge kontsentratsiooni korral muutub liblikõieliste taimede füsioloogiline seisund (taime juurerakkudes on lahustuvate lämmastikuühendite sisaldus suur) sedavõrd, et mügarbakterid ei ole võimelised tungima juurerakkudesse ja moodustama mügaraid (Tšailahjan ja Megrabjan, 1945).

Kirjanduse andmetel reageerivad mügarbakterid nitraatide ja ammooniumlämmastiku ühesuguste kontsentratsioonide korral mullas erinevalt (Štšvetsova, 1931; Virtanen jt., 1947; Virtanen, 1953; Fjodorov, 1952; Bergersen, 1961).

Virtaneni jt. (1947; 1953) andmetel lakkas *Rhizobium* õhulämmastikku sidumast nitraatide kontsentratsiooni korral 30—50 mg 1 liitri mullalahuse kohta, kuid ammooniumlämmastikusisalduse korral 100 mg 1 liitri mullalahuse kohta kaotasid mügarbakterid õhulämmastiku sidumise võime ainult osaliselt. Fjodorovi (1952) andmetel on nendeks kontsentratsioonideks, mille puhul bakterid kaotavad õhulämmastiku sidumise

võime vastavalt 1 : 10000 (nitraatide korral) ja 1 : 2000 (ammooniumlämmastiku korral). Arvestades eeltoodud andmeid, võib väita, et mineraalse lämmastiku madalad kontsentratsioonid soodustavad õhulämmastiku sidumist *Rhizobium*'i poolt. Mõnevõrra kõrgema kontsentratsiooni korral õhulämmastikku siiski veel seotakse, kuid juba vähem, kusjuures üha rohkem hakatakse kasutama mineraalset lämmastikku. Veelgi suurema lämmastikusisalduse puhul kasutavad taimed ainult mineraalseid lämmastikuühendeid ja õhulämmastiku sidumine mügarbakteritega ei ole üldse võimalik.

Konkreetne mineraalsete lämmastikuühendite kontsentratsioon iga eespool nimetatud astme kohta on nähtavasti võrdlemisi varieeruv suurus, olenedes niihästi teiste toiteelementide sisaldusest, keskkonnatingimustest kui ka *Rhizobium*'i liigi omadustest.

Kas aga kõrge lämmastikuühendite kontsentratsiooni korral kaotavad mügarbakterid õhulämmastiku sidumise võime täielikult ja tagasipöördumatult, selle kohta kirjanduses andmed puuduvad.

Mikroelemendid. *Rhizobium*'ile kõige olulisemaks mikroelemendiks peetakse üksmeelselt molübdeeni (Golik, 1937; Obraztsova, 1937; Šulakov, 1937; Anderson jt., 1946; Jensen, 1948; Mulder, 1950; Becking, 1961; Peterburgski jt., 1962; Klincare, 1963; Tevari, 1963; Pacheco Baseuco Juan, 1964). Seejuures tõestas Jensen, hiljem ka Mulder, Peterburgski jt. ning Turtšin jt., et mügarbakterid ei seo lämmastikku nende hea kasvu ja küllaldase mügarate arvu puhul siis, kui mullas leidub vähe molübdeeni.

Molübdeen on nähtavasti vajalik komponent fermendile nitrogenaas, mis katalüseerib õhulämmastiku sidumist mügarbakterite poolt sümbioosis liblikõielistega (Bauer, 1960; Cheniae jt., 1960; Peive jt., 1961, 1966; Peive jt., 1965).

On kindlaks tehtud, et molübdeeni optimaalseks sisalduseks mullas, mille puhul mügarbakterid sümbioosis liblikõielistega võivad fikseerida õhulämmastikku, on 1 g naatriummolübdaati 100 m^2 pinna kohta (Jensen, 1948).

Mulder (1950) märkis, et molübdeenidoosiks, mis suurendab lämmastiku sidumise võimet ja liblikõieliste saaki, on Austraalias 5 mg naatriummolübdaati 2 kg mulla kohta.

Klincare (1963) leidis, et juba 3 mg naatriummolübdaati 1 kg mulla kohta tõstab herneterades lämmastikusisaldust peaaegu 1% võrra ning suurendab mügarate arvu ja kaalu. Eriti hästi tuli ilmsiks molübdeeni positiivne mõju liblikõieliste taimede saagikusele lupjamata muldade korral.

Ka Bulavskaja (1959) andmetel suureneb ammooniummolübdaadi kontsentratsiooni korral 1 kg 1 ha kohta liblikõieliste taimede lämmastikusisaldus ja mügarate arv nende juurtel.

Mitmed autorid märgivad ka boori suurt osatähtsust mügarbakterite õhulämmastiku sidumise võimele ja liblikõieliste taimede arengule (Fred jt., 1932; Warington, 1926; Mišustin jt. 1935; Šestakova, 1940; Fjodorov, 1944; Turtšin jt., 1958; Klincare, 1963; Pacheco, 1964). Klincare märkis, et *Rhizobium*'i normaalseks arenemiseks ja lämmastiku efektiivseks sidumiseks on vaja 1,5 mg boori 1 kg mulla kohta. Tevari (1963) on aga vastupidisel seisukohal. Ta leidis, et kui 1 ha kohta anda 11,2 kg boorhapendit, siis väheneb nii mügarate arv liblikõieliste juurtel kui ka taimesaak.

Kirjanduse andmetel avaldavad ka mitmed teised mikroelemendid positiivset mõju *Rhizobium*'i mügarate moodustamise ja õhulämmastiku sidumise võimele. Nendeks on mangaan (Klincare jt., 1963), vask (Klincare jt., 1963; Pacheco, 1964), tsink (Klincare jt., 1963; Pacheco, 1964), raud (Bergersen, 1961; Pacheco, 1964) jt.

Viimasel ajal märgitakse ka radioaktiivsete elementide, nagu strontsiumi, uraani, raadiumi ja tooriumi vajadust mügarbakteritele ning peremeestaimedele üliväikestes kogustes (Drobkov, 1945; Shaukat jt., 1959, 1961; Michilis, 1960). Vähem on kirjanduses konkreetseid andmeid selle kohta, millised on mikroelementide (välja arvatud molübdeen) optimaalsed kogused mullas mügarbakterite normaalseks arenemiseks ja intensiivseks lämmastiku sidumiseks.

5. LIBLIKÕIELISTE JA MÜGARBAKTERITE VAHELINE SÜMBIOOS

Liblikõieliste taimede ja mügarbakterite vaheline sümbioos avaldub ühelt poolt selles, et mügarbakterid on võimelised tungima liblikõieliste juurekudedesse, kus nad põhjustavad mügarate moodustumist ja muudavad õhulämmastiku taimedele kättesaadavaks, teiselt poolt aga selles, et mügarbakterid saavad taimedelt süsivesikuid, mis on energiaallikaks kõigis elutegevusprotsessides, sealhulgas molekulaarse lämmastiku fikseerimisel.

Sümbioos mügarbakteritega määrabki liblikõieliste sugukonna omapära.

On kindlaks tehtud, et juuremügarate moodustamise võime liblikõielistel erineb liigiti (Fred jt., 1932), mille põhjused ei ole veel täiesti selged. Osa autoreid (Thimann, 1936; 1939; Purchase, 1953) arvab selle tingitud olevat bakteritest: sellele või teisele peremeestaimele spetsiifilise *Rhizobium*'i liigi või mõne madalama taksonoomilise ühiku puudumisest. Teiste autorite (Carroll, 1934; Vincent, 1945; Thornton, 1954; Manil, 1958) arvates peituvad erinevuse põhjused eeskätt taimedes — geneetilistes faktorites, toksiliste ainete eritamises või füüsikalise struktuuri sobimatuses.

Enamiku uurimisandmete põhjal võib väita, et mügarate moodustumine ainult liblikõielistel taimedel sümbioosis perekonna *Rhizobium*'i eri liikidega on juba tõestatud. Selle selgitamiseks on püstitatud mitu hüpoteesi. Hanseni ja Tanneri (1931) arvates on see tingitud bakterite ja taimevalkude sobivusest või sobimatusest, Carrolli (1934) väitel erilise fermendi olemasolust, mida moodustab taim ning mis on võimeline lämmastikku valikuliselt juhtima edasistesse protsessidesse. Ent neil ei ole suurt tähtsust. On ju üsna kindel, et sümbioosi tekkeks on vajalik biokeemiline sobivus peremehe ja sümbiondi vahel. Mõne autori arvates on siin määravaks liblikõieliste juuresüsteemi arengu iseärasused ja koesisesed füüsikalised ning keemilised tingimused, nagu nõrk aurumistase ja juurtesse suunduva mahla happeline reaktsioon (Lemmermann, 1907) või ka kõrge kaltsiumisisaldus, mis liblikõielistel on McCalla (1937) andmetel 3—5-kordne, võrreldes teiste taimedega. Seda arvamust toetab ka Albrecht (1937). On tõsi, et liblikõielistes on leitud rohkem kaltsiumi kui teistes rohttaimedes, kuid see ei selgita mingil määral mügarate olemasolu liblikõieliste juurtel. Tegelikult on palju taimi, mis sisaldavad niisama palju või isegi rohkem kaltsiumi kui liblikõielised. Näiteks olgu toodud mõned arvud kaltsiumisisalduse kohta taimedes (protsentides toorkaalust): lutsern — 0,35; punane ristik — 0,24; lehtkapsas — 0,25; kapsas — 0,24; okasmalts — 0,66 (Manil, 1958). Samuti on hästi teada, et mineraalelementide sisaldus taimedes sõltub suurel määral nende elementide sisaldusest ja omastatavusest mullas. Juba ammu oli teada, et kaltsium mõjutab liblikõieliste üldarengut ja lämmastiku sidumist sümbioosis mügarbakteritega. Kuid see aspekt ei puuduta käesolevat probleemi ja seda käsitletakse kirjanduse ülevaate neljandas peatükis.

Viimaste aastate uurimistulemuste põhjal arvatakse, et põhjus on peremeestaime ja bakterite geneetilistes omadustes, mis teineteist mõjutavad (Aughtry, 1948; Lynch jt., 1951; Williams jt., 1954; Nutman, 1956).

Ilmne raskus selle nähtuse seletamisel on tekkinud kahest väga tähtsast faktist: 1) eksisteerib kaks organismi, millest kumbki on võimeline elama sõltumata teisest; 2) lahus elades on nad mõlemad võimetud siduma õhulämmastikku.

Mida peab siis võtma lugejaks ja mida nimetajaks, nagu küsisid E. ja O. Allen (1950), kas liblikõielist taime või mikroobi.

E. ja O. Allen (1961) märkisid, et mügarate moodustamise seisukohalt on läbi uuritud ainult 1285 liblikõieliste liiki, s. o. 10—12% liblikõielistest. Nendest 1112 liigil ehk 88%-l esinevad mügarad, kuna 166 liigil ilmselt puudub võime sümbioosiks *Rhizobium*'iga. Alamsugukonnas *Papilionoideae* puudub 65 liigil 959-st võime moodustada mügaraid. *Caesalpinoidea* alamsugukonnas on täheldatud mügaraid 26 liigil ja *Mimosoideae* alamsugukonnas 127 liigil 146-st uuritud liigist. Seega

kerkib küsimus: kas on tõesti olemas mõningad liblikõieliste liike, mis ei ole võimelised mügaraid moodustama, või pole mõningatel liblikõielistel mügaraid täheldatud ainult sellepärast, et puudus nende jaoks spetsiifiline *Rhizobium*'i liik või olid ökoloogilised tingimused ebasobivad. Oleks huvitav uurida mõningaid liblikõielisi, millel ei ole mingites tingimustes mügaraid leitud, ja võrrelda neid mügarduvate liblikõielistega. Tegelikult oleks kergem võrrelda üksteisega liike ühe alamsugukonna või perekonna piirides kui liike, mis kuuluvad eri alamsugukondadesse või perekondadesse, sest esimesel juhul võiksid täheldatavad erinevused olla olulisemad.

Kirjanduses ei leidu ühtegi vihjet otseste inokulatsioonikatsete kohta (näiteks mikromanipulaatorite varal), mille puhul viiakse mingit mügarbakterikultuuri nendele bakteritele mittevastuvõetava taime juurekarvakese epidermisesse või kooreparenhüümi. Nendeks taimedeks võiksid olla ka mitteliblikõielised. Sellised katsed võiksid heita mõningat valgust juurekarvakeste kõverdumise tähtsusele, s. o. nähtusele, mis eelneb infektsioonile. Juurekarvakeste kõverdumine näib olevat tingitud indolüülääadikhappe tekitamisest *Rhizobium*'i poolt (Frey-Wyssling, 1948; 1952; Labaw ja Mosley, 1954; Nutman, 1956, 1958; Fåhraeus, 1957). Tegelikult võivad ka mittespetsiifiline *Rhizobium* ja mitmed teised bakterid, mis on *Rhizobium*'ist taksonoomiliselt suhteliselt kaugel, produtseerida indolüülääadikhapet (Manil, 1958). Võib järeldada, et karvakeste kõverdumine on mittespetsiifiline etapp, kuigi see võib olla vajalik. Oleks siiski huvitav uurida, kas selline kõverdumine võib tekkida *Rhizobium*'i mõjul ka mitteliblikõieliste taimede juurtel.

Üks põhjusi, miks mitteliblikõieliste juurtel ei moodustu mügaraid, võib olla nende taimede poolt produtseeritud ainete antibiootiline toime *Rhizobium*'isse, nagu seda on täheldanud Manil (1958). Kuid paistab, et üldreeglina see ei kehti ega kujuta endast argumenti liblikõieliste ja mügarbakterite assotsiatsiooni spetsiifilisuse kasuks.

Infektsioon ei ole mitte alati seotud mügarate moodustumisega. Näiteks on leitud *Rh. trifolii* baktereid lutserni ilma meristemaatilise aktiivsuseta parenhüümirakkudes (Chen, 1941). Säärane infektsioon võiks hästi aset leida ka mitteliblikõieliste taimede juurerakkudes. Kuid praegu ei ole meil selle kohta mingisugust eksperimentaalset kinnitust. Küll aga võib leida andmeid mitmesuguste teiste bakterite sissetungimisest mitteliblikõieliste taimede kooreparenhüümi (Fred jt., 1932). Liblikõieliste taimede inokuleerimisel ilmneb omapärane asjaolu: kirjanduse andmetel on teada, et juurestikus esineb ka haploidseid rakke, infitseeritud rakkudel on aga alati kahekordne kromosoomide arv. Tsütoloogilistel andmetel näib olevat kindel, et tegemist ei ole kromosoomide arvu kahekordistumisega infektsiooni tagajärjel, vaid et infitseeruvad ainult diploidsed rakud (Wipf ja Cooper, 1938, 1940; Wipf, 1939; Bond, 1948; Fujita ja Mitsuishi, 1953).

Mügarbakterite sissetungi mehhanismi probleemi lahendamine aitaks välja selgitada ka liblikõieliste ristinokulatsioonirühmadesse jaotamise alused. Siiani on olnud liblikõieliste ja mügarbakterite vahelise sümbioosi tulemus — mügarate moodustumine (nn. Kochi postulaat) — ainuke kriteerium, mille alusel jaotatakse liblikõielised ristinokulatsioonirühmadeks).

Oma klassikalises monograafias eristasid Fred jt. (1932) 16 ristinokulatsioonirühma. Liblikõieliste ja mügarbakterite sümbioosi uurimised viimase 20 aasta jooksul on viinud ristinokulatsioonirühmade-vaheliste piiride kadumise suunas.

Eriti huvitavaks tuleb pidada Wilsoni töid (1939—1947). Ta tegi arvukalt inokulatsioonikatseid steriilses liivkultuuris mitmesaja taimeliigiga ning leidis hämmastavalt palju juhtumeid, mida ta nimetas kahtlaseks infektsiooniks peremeestaime ja *Rhizobium*'i vahel. Piisab mõnest näitest:

1. Lutsern moodustas mügaraid nakatamisel *Rhizobium*'i 15 (30-st) eri tüvega, mis olid eraldatud samalt arvult peremeestaimedelt. Enamik tüvedest, mis ei mügardanud lutserni, kuulusid *Vigna* rühma. Mügaraid olid võimelised moodustama tüved *Vicia villosa*'lt *(Rh. leguminosarum)* ja *Trifolium pratense*'lt *(Rh. trifolii)*.

2. *Astragalus rubi* mügardus *Rhizobium*'i 24 (30-st) tüvega, sealhulgas ka *Rh. meliloti (Medicago sativa)* ja *Rh. trifolii*'ga.

3. *Crotalaria grantiana* moodustas mügaraid vähemalt 137 (182-st) tüvega, mis olid isoleeritud samalt arvult eri liblikõielistelt. Tüvede hulgas, mis moodustasid mügaraid, olid ka lutserni ja ristiku mügarbakterid.

4. *Astragalus sp.*-lt isoleeritud 21 tüve moodustasid mügaraid 22 peremeestaimel 18-st perekonnast. Nende hulgas olid nii erinevad taimed, nagu *Medicago* ja *Wistaria.* Seega näib olevat alust Wilsonil (1944), et ta väitis: «On vähemalt 500 põhjust, et visata kõrvale ristinokulatsioonirühmad.» Reservatsiooniks võiks olla see, et ta uuris ainult mügarate moodustumist, mitte aga nende lämmastiku sidumise võimet, kusjuures paljudel juhtudel oli mügarate moodustumine väga nõrk, umbes ühel taimel 100-st tekkisid mõningad (mitteefektiivsed) mügarad.

Siiski on kogunenud üsna palju tõendeid, mis kinnitavad Wilsoni tähelepanekute põhilisi seisukohti. Näiteks E. ja O. Allen (1940) leidsid, et sojalt isoleeritud *Rh. japonicum* on võimeline moodustama suhteliselt efektiivseid mügaraid *Arachis hypogaea*'l, mis kuulub *Vigna* rühma. Ka paljud teised tüved *(Rh. phaseoli* ja *Rh. lupini)* produtseerivad hulgaliselt mitteefektiivseid mügaraid.

Kleczkowska, Nutman ja Bond (1944) ning Kleczkowska ja Thornton (1944) näitasid, et mitmed *Rh. trifolii* ja *Rh. leguminosarum*'i tüved võivad infitseerida üksteise peremeestaimi (vastavalt ristikut ja hernest), kusjuures tekib vähe (mitteefektiivseid) mügaraid. Veelgi hämmastavamat pilti on näidanud *Caragana arborescens*'ilt isoleeritud mügarbakteri

tüved (Gregory ja Allen, 1953): kaheksast tüvest üks ei infitseerinud ka omaenda peremeestaime, kuid andis mügaraid mõningatel teistel taimedel, näiteks *Lespedeza*'l. Ülejäänud tüved evisid mõõdukat või head mügarate moodustamise võimet viiel taimel seitsmest, mis pärinesid eri liblikõieliste perekondadest. Ühel juhul *(Lotus corniculatus)* osutusid mügarad efektiivseteks, kuid *Lotus uliginosus*'el ei tekkinud üldse mügaraid.

Teisest küljest ei mügardanud *Caragana*'t ennast ükski 30-st mügarbakteri tüvest, mille hulgas oli *Rhizobium*'i 6 tunnustatud liiki. Seepärast on sellise peremeestaime sümbionti väga raske seostada mõne kindla ristinokulatsioonirühmaga. Bushnell, Sarles (1937) ja Reid (1936) näitasid teatud kergeastmelist ristinokulatsiooni *Vigna, Soja* ja lupiini rühma vahel, kusjuures see ristinokulatsiooni aste sõltus aastaajast, millal katset tehti.

Aughtry (1948) andmetel moodustusid mügarad *Medicago falcata*'l ja *Medicago sativa*'l *Astragaluse*'e liikidelt eraldatud bakteritüvede mõjul.

Kirjanduse andmed näitavad, et meie teadmised liblikõieliste ja mügarbakterite sümbioosist pärinevad peamiselt bakteritüvede varieeruvuse uurimistest. Vähe katseid on aga tehtud eesmärgil uurida spetsiaalselt peremeestaimede osa selles sümbioosis.

Bjälfve (1933, 1937), märkides peremeestaimede suurt osatähtsust sümbioosis bakteritega, tegi järelduse, et liblikõieliste taimede mingi pärilik faktor mõjutab mügarate suurust, kuju ja asukohta taimede juurtel. Ideed, et mingi eriline faktor määrab taime infitseerimise sümbiondi poolt, pooldas ka Sievers (1954), kes kirjutas: «Siiski peab taimede juurte infektsioon sümbiontide poolt sõltuma mõningatest tundmatutest faktoritest, nagu seda võib järeldada infektsioonikatsetest.»

Paistab, et teadmiste praeguse taseme juures ei suuda me täie kindlusega seletada põhjust, miks *Rhizobium*'i sümbioos piirdub ainult liblikõielistega. Siin tuleks märkida, et see on üldse kogu elava looduse «spetsiifilisuse» probleem: kuidas seletada, et teatav viirus või mikroob suudab nakatada ainult antud taime või looma, kuidas seletada, et sellel või teisel organismil on tunnuseid, mis puuduvad teistel jne.

II. EKSPERIMENTAALOSA

1. MÜGARATE ESINEMINE JA MORFOLOOGIA EESTIS KASVAVATEL LIBLIKÕIELISTEL

Uurimise eesmärgiks oli analüüsida mügarate ja mügarbakterite esinemist võimalikult paljudel Eestis kasvavatel liblikõielistel taimeliikidel. Teatavasti on enamik metsikult kasvavaid liblikõielisi selles suhtes alles üsna puudulikult läbi uuritud, eriti Eesti NSV ja ka kogu NSV Liidu maaalal. Venekeelses kirjanduses on vaid mõned üksikud autorid seda küsimust möödaminnes käsitlenud (Petrosjan, 1959; Kalninš jt., 1962; Verner jt., 1967). Väliskirjanduses võib märkida Allenit ja Baldwini (1954), E. ja O. Allenit (1961) ning Rangaswami ja Oblisami (1962). Nimetatud autorid märgivad, et mügarate moodustamise võimet on uuritud ainult ligikaudu 1300 liigil (243 perekonnast), kusjuures 1112 liigil (213 perekonnast) neid leiti, 166 liigil aga mitte ja 7 liiki olid kahtlased. Võrdluseks olgu öeldud, et liblikõieliste sugukonda kuulub umbes 550 perekonda 13 000 liigiga.

Teatavasti tähendab teatud liblikõieliste liike nakatava mügarbakteri liigi või tüve esinemine looduslikus mullas seda, et vastavate liblikõieliste kultuuride külvi puhul sellisesse mulda võib esineda spontaane nakatumine ja mügarate moodustumine. Ei ole täiesti välditud ka võimalus, et looduslike mügarbakterite tüvede seas võiks esineda selektsioonitööks kasulikke.

«Eesti taimede määrajas» (Talts, 1966) esineb 25 liblikõieliste perekonda 84 liigiga (sealhulgas 4 pisiliiki). Nendest 10 perekonda, kokku 42 liigiga on märgitud haruldastena või paiguti esinevatena. Mõningaid neist on leitud vaid aastate eest ja üksikutel juhtudel. Seetõttu ei olnud meil võimalik läbi uurida kõiki kirjeldatud liike.

Metoodika

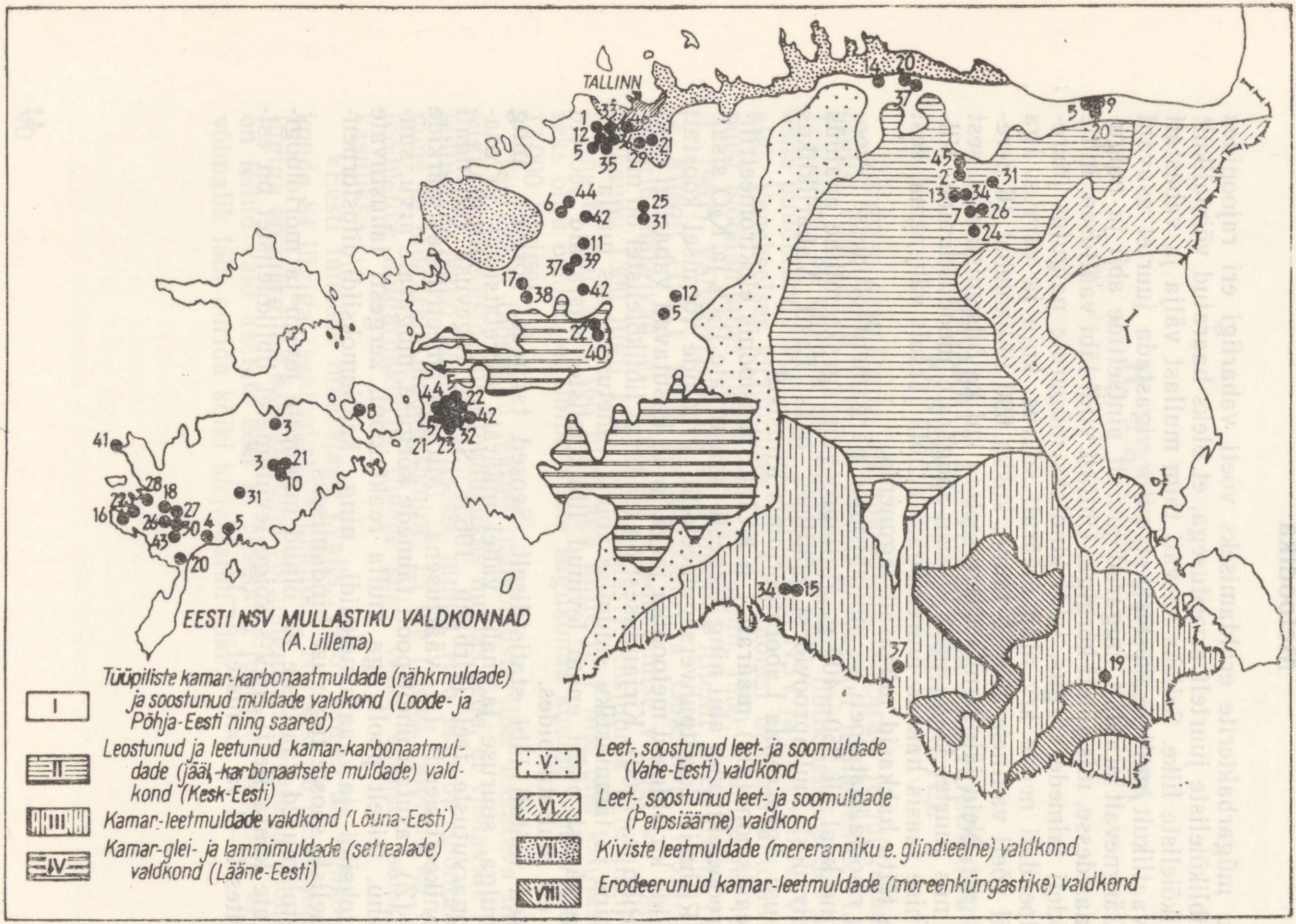
Mügarad mügarbakterite eraldamiseks võeti vabariigi eri rajoonides kasvavate liblikõieliste juurtelt arvestusega, et oleks haaratud võimalikult rohkem liblikõieliste liike. Selleks kaevati taim mullast välja ja vabastati juured ettevaatlikult mullaosakestest, et mitte vigastada juurtel asuvaid mügaraid. Järgnevalt eraldati mügarad juurelt pintsettide abil ja paigutati katseklaasidesse, mis suleti korgiga. Ühtlasi viidi läbi vaatlused, mille käigus mõõdeti taimede kõrgus, tehti kindlaks mügarate paigutus juuresüsteemil, loendati nende arv ning määrati suurus, kuju ja värvus. Iga mulla erimil võeti vaatluse alla 10 taime, kokku 690 liblikõielist 16 perekonna 46 liigist. Neid jälgiti nii õitsemiseelses kui ka õitsemisfaasis, sest sel ajal toimus juurtel kõige intensiivsem mügarate moodustumine. Viljade valmimise faasis hakkas juuremügarate hulk järsult vähenema, sest vananemise tõttu hakkasid mügarad lagunema.

Taimede risosfäärist võeti ka mullaproovid pärgamentkottidesse. Proovide keskmine kaal oli 250—400 g. Mullaproovide agrokeemiline analüüs tehti õhukuivadest mullaproovidest põhilises osas Eesti Vabariiklikus (piirkondlikus) Agrokeemia Laboratooriumis Kuusikul.

Mulla reaktsioon (pH) määrati 1 n KCl suspensioonis elektromeetriliselt kinhüdroonelektroodi abil ning kergesti lahustuvate P_2O_5 ja K_2O sisaldus Egnes-Riehmi laktaatpuhversegumeetodil. Proovide võtmisel koostati mullaprofiilide kirjeldused metoodika järgi, mida kasutavad vabariigi mullauurijad (Piho jt., 1960). Kirjandusest on teada, et liblikõielistel on mügarate esinemine ja lämmastiku sidumise võime vahetus seoses mulla omadustega. Seepärast püüti enam levinud liblikõielistel vastavaid seoseid analüüsida eri mullatüüpides.

Tulemused töötati läbi statistiliselt. Seosed taimede kõrguse ning mügarate hulga, suuruse ja mahu vahel määrati korrelatsioon- ja osakorrelatsioonarvutuste teel (Urbahh, 1963). Seoste tugevust väljendati korrelatsioonikoefitsiendi (r) väärtusena. Mitteparameetriliste märkide kriteeriumi (Z) kasutati ühelt poolt taimede kõrguse, mügarate arvu, suuruse ja mahu, teiselt poolt aga mulla reaktsiooni, kergesti lahustuvate difosforpentoksiidi ja kaaliumoksiidi ning kaaliumoksiidi/difosforpentoksiidi vaheliste seoste tugevuse hindamiseks.

Uurimistulemused vaatluste all olnud mügarate leviku ja morfoloogiliste näitajate kohta Eesti NSV-s kõige levinumatel liblikõielistel on esitatud tabelites 2—4 ja joonistel 3—11.



Joonis 3. Liblikõieliste kogumise kohad. *1 — Lupinus luteus, 2 — Lupinus polyphyllus, 3 — Ononis repens, 4 — Ononis arvensis, 5 — Medicago lupulina, 6 — Medicago falcata, 7 — Medicago sativa, 8 — Melilotus dentatus, 9 — Melilotus officinalis, 10 — Melilotus albus, 11 — Trifolium montanum, 12 — Trifolium repens, 13 — Trifolium hybridum, 14 — Trifolium spadiceum, 15 — Trifolium strepens, 16 — Trifolium fragiferum, 17 — Trifolium medium, 18 — Trifolium alpestre, 19 — Trifolium pratense, 20 — Trifolium arvense, 21 — Anthyllis vulneraria, 22 — Lotus corniculatus, 23 — Tetragonolobulus siliquosus, 24 — Caragana arborescens, 25 — Astragalus danicus, 26 — Astragalus glycyphyllus, 27 — Oxytropis pilosa, 28 — Onobrychis viciifolia, 29 — Vicia tetrasperma, 30 — Vicia cassubica, 31 — Vicia sylvatica, 32 — Vicia cracca, 33 — Vicia sepium, 34 — Vicia sativa, 35 — Vicia faba, 36 — Lathyrus odoratus, 37 — Lathyrus sylvestris, 38 — Lathyrus pratensis, 39 — Lathyrus palustris, 40 — Lathyrus pisiformis, 41 — Lathyrus maritimus, 42 — Lathyrus vernus, 43 — Lathyrus niger, 44 — Pisum arvense, 45 — Pisum sativum, 46 — Phaseolus vulgaris.*

Uurimistulemused

Uurimine näitas, et kõigil vaatluse all olnud liblikõielistel, välja arvatud *Astragalus glycyphyllus*, leidub mügaraid (tabel 2). Et aga Jenseni (1963) andmeil esineb mügaraid ka sellel liigil, tuleb enne lõpliku järelduse tegemist seda liiki veel kontrollida. Mügarate puudumise põhjuseks meie vaatlusmaterjalis võisid olla kas mulla happeline reaktsioon (pH_{KCl} 5,0—5,7) või liiga madal kergesti lahustuvate difosforpentoksiidi ja kaaliumoksiidi sisaldus (tabel 2).

Mügarad asetsesid liblikõielistel taimedel nii pea- kui ka külgjuurtel. Nad olid juurtega tihedasti seotud ja nende pind oli kas sile või kare. Mügarate kuju ja suurus varieerus sõltuvalt peremeestaimedest. Suhteliselt kõige suuremad mügarad (5—8 mm) olid *Lathyrus odoratus*'el, *L. maritimus*'el, *Astragalus danicus*'el, *Vicia sylvatica*'l, *V. faba*'l, *Phaseolus vulgaris*'el, *Lupinus luteus*'el ja *L. polyphyllus*'el, kõige väiksemad (0,5—1,5 mm) aga *Lotus corniculatus*'el ja *Trifolium*'i liikidel. Teistel kõikus mügarate suurus 1,5—3,5 mm piirides (tabel 2).

Paljude autorite (Fred jt., 1932; Chen, Thornton, 1940; Razumovskaja ja Vassiljeva, 1956; Fjodorov ja Nitse, 1961; Jones, Careth, 1963) arvates on mügarate suurus liblikõielistel liigi piirides korrelatsioonis mügarbakterite efektiivsusega. Efektiivsuseks nimetatakse summaarset resultaati, mis avaldub taimede kasvus ning mullaviljakuses mügarbakterite toime tagajärjel. Seega, mida suuremad on mügarad, seda rohkem seovad nad õhulämmastikku. Ainult lupiini puhul on täheldatud vastupidist korrelatsiooni (Deherain, Demoussy, 1960; Dorossinski jt., 1960).

Et meie taimede lämmastikusisaldust ei määranud, pole võimalik selles küsimuses oma seisukohta esitada. Taimede kõrguse ja mügarate suuruse vahelise seose määramiseks tehtud korrelatsioon- ja osakorrelatsioonarvutused aga näitasid, et mõnel juhul on mügarate suurus korrelatsioonis taimede kõrgusega (tabel 3). Nagu tabelis esitatud andmetest nähtub, on selline seos *Lathyrus vernus*'el, *Anthyllis vulneraria*'l ja *Medicago lupulina*'l. Neil juhtudel, mil kolmanda faktori (mügarate arv) mõju oli täielikult välistatud, esines korrelatsioon taimede kõrguse ja mügarate suuruse vahel 8 taimeliigil: *Lathyrus vernus*'el, *L. sylvestris*'el, *Trifolium arvense*'l, *T. repens*'il, *Ononis arvensis*'el, *Lotus corniculatus*'el, *Anthyllis vulneraria*'l ja *Medicago lupulina*'l. Et taimede kõrgust võib pidada kaudseks lämmastikusisalduse peegeldajaks, siis näitas andmete statistiline analüüs, et suuremate mügarate korral seotakse ka rohkem õhulämmastikku. Samasse liblikõieliste perekonda kuuluvatel liikidel oli mügarate kuju sageli erinev. Nii leiti *Trifolium*'i liikidel ümmargusi ja kepikujulisi, *Vicia* liikidel ümmargusi, nuia- ja käpakujulisi mügaraid. *Tetragonolobus*'e, *Lotus*'e, *Oxytropis*'e, *Ononis*'e ja *Anthyllis*'e perekonnas olid aga

Taim	Leiukoht	Mullaerimi šiffer	Mulla			
			lõimis	pH	P_2O_5	K_2O
					100 g õhukuivas mullas mg	
1	2	3	4	5	6	7
Lupinus luteus	Harju raj., Harku, aed	K‴	ls	7,2	14,0	11
Lupinus polyphyllus	Rakvere raj., Põlula, aed	Ko	ls	6,9	18,0	13
Ononis repens	Kingissepa raj., Leisi, teeserv	Kog	ls	6,8	1,5	7
	Kingissepa raj., Kaali, teeserv	K″	ls	7,2	3,0	19
Ononis arvensis	Kingissepa raj., Suurlahe järv, karjamaa	Kg	l	7,3	5,0	2
	Haapsalu raj., Laelatu, puisniit	K‴	ls	6,8	5,0	15
	Samas	Kg	ls	7,1	2,0	7
Medicago lupulina	Haapsalu raj., Laelatu, puisniit	K‴	ls	7,2	9,0	14
	Samas	K‴	ls	6,9	4,0	8
	Kingissepa raj. Kingissepa, teeserv	Kg	ls	7,3	11,0	10
	Rapla raj., Rõkalu, teeserv	Kg	ls	7,2	6,0	4
	Harju raj., Harku, sööt	Kg	sl	7,0	4,5	8
	Rakvere raj., Alulinna, karjamaa	Kg	ls	7,3	16,0	5
Medicago falcata	Haapsalu raj., Laitse, põlluserv	K″	ls	7,2	4,0	21
Medicago sativa	Rakvere raj., Kulina, põld	K″	ls	6,7	35,0	30
Melilotus dentatus	Kingissepa raj., Muhu, mererand	Kg	ls	7,2	7,5	14

Andmed taimede kõrguse ja mügarate kohta on antud 10 taime keskmisena.

Kg — gleistunud karbonaatne kamarmuld,
K‴ — keskmise sügavusega tüüpiline kamar-karbonaatmuld,
K″ — õhuke tüüpiline kamar-karbonaatmuld,
Ko — leostunud kamar-karbonaatmuld,
$K_o g$ — gleistunud leostunud kamarmuld,
Gk — karbonaatne kamar-gleimuld,
Lk_1 — nõrgalt leetunud kamar-leetmuld,

juuremügarate morfoloogiline iseloomustus

Taimede kõrgus cm	Mügarate			
	arv	kuju	suurus mm	värvus
8	9	10	11	12
49	10	Ovaalne	5,0—8,0	N — pruunikas-valge V — pruunikas-must
68	7	Ümmargune ja ovaalne	5,0—8,0	Sama
26	6	Ümmargune	1,0—2,5	N — valge V — nõrgalt pruunikas
31	9	Sama	1,0—2,5	Sama
38	11	Sama	1,0—2,5	Sama
36	11	Sama	1,0—2,5	Sama
36	7	Sama	1,0—2,5	Sama
43	49	Käpakujuline	2,0—6,0	N — pruunikas-valge V — pruunikas-must
31	29	Sama	2,0—6,0	Sama
43	36	Sama	2,0—6,0	Sama
39	38	Sama	2,0—6,0	Sama
29	32	Sama	2,0—6,0	Sama
42	62	Sama	2,0—6,0	Sama
57	13	Sama	2,0—6,0	Sama
53	22	Sama	2,0—6,0	Sama
88	21	Sama	2,0—6,0	Sama

Lk_{II} — keskmiselt leetunud kamar-leetmuld,
L_{II} — keskmiselt leetunud leetmuld,
K_1g — gleistunud leetunud kamarmuld,
M_2' — turvas-kõdu-glei-madalsoomuld,
Go — leostunud kamar-gleimuld,
l — liiv, sl — saviliiv, ls — liivsavi, t_2 — keskmiselt lagunenud turvas,
N — noorena, V — vanana.

1	2	3	4	5	6	7
Melilotus officinalis	Rakvere raj., Alulinna, teeserv	K″	ls	7,2	8,0	3
Melilotus albus	Kingissepa raj., Kaali järv, teeserv	K″	sl	7,0	30,0	18
Trifolium montanum	Rapla raj., end. Kernu mõis, kuiv niit	Ko	sl	6,8	1,0	6
Trifolium repens	Rapla raj., Kadaka, teeserv	Go	l	5,9	4,5	5
	Harju raj., Harku, puisniit	Kog	sl	7,0	5,5	7
Trifolium hybridum	Rakvere raj., Küti, teeserv	K‴	sl	7,3	10,0	9
Trifolium spadiceum	Rakvere raj., Sagadi, karjamaa	K‴	ls	6,7	>40,0	6
Trifolium strepens	Viljandi raj., end. Pöögle mõis, metsaserv	Lk_{II}	sl	5,3	1,5	2
Trifolium fragiferum	Kingissepa raj., Atla laht, karjamaa	Gk	sl	7,1	5,0	40
Trifolium medium	Haapsalu raj., Risti, metsaserv	K″	sl	7,1	5,5	13
Trifolium alpestre	Kingissepa raj. Viidumäe, männimets	Lk_{I}	l	5,6	2,0	7
Trifolium pratense	Võru raj., Husari, raudteetamm	Kg	l	7,1	5,0	5
Trifolium arvense	Rakvere raj., Oandu, sööt	Ko	l	6,7	13,0	3
	Kingissepa raj., Salme küla, teeserv	Kg	l	7,0	3,0	1
	Rakvere raj., Alulinna, karjamaa	Kog	l	6,0	8,0	2
Anthyllis vulneraria	Haapsalu raj., Laelatu, puisniit	Kg	ls	7,0	5,0	13
	Kingissepa raj., Kaali järv, teeserv	Ko	l	7,0	3,0	1
	Harju raj., Männiku, raudteetamm	K″	l	7,4	6,0	2
Lotus corniculatus	Haapsalu raj., Laelatu, puisniit	Kg	ls	6,9	4,0	8
	Kingissepa raj., Atla, karjamaa	L_{II}	l	4,7	3,0	8
	Rapla raj., Nõmmealuse, teeserv	Ko	sl	7,0	0,5	10
Tetragonolobus siliquosus	Haapsalu raj., Laelatu, puisniit	Kg	ls	7,0	2,5	24
Caragana arborescens	Rakvere raj., Roela, puukool	K‴	l	6,8	6,5	7
Astragalus danicus	Rapla raj., Hageri, metsaserv	Ko	sl	7,0	1,5	3

Tabel 2 (järg)

8	9	10	11	12
84	17	Sama	2,0—6,0	Sama
73	20	Piklik ja käpa-kujuline	2,0—6,0	Sama
28	6	Ümmargune	1,0—3,0	N — roosakas-valge V — pruunikas
26	18	Piklik ja kepikese kujuline	1,0—3,0	Roosakas-valge
31	22	Sama	1,0—3,0	Sama
19	29	Ümmargune	1,0—3,0	N — roosakas-valge V — pruunikas
16	25	Sama	1,0—3,0	Sama
19	23	Ümmargune	1,0—3,0	N — roosakas-valge V — pruunikas
10	24	Piklik	0,5—2,0	Sama
28	28	Ümmargune	1,5—3,5	Sama
31	24	Sama	1,0—3,0	Sama
25	15	Sama	1,0—3,0	Sama
16	28	Ümmargune ja piklik	0,5—3,0	N — valge V — nõrgalt pruun
16	26	Ümmargune	0,5—3,0	Sama
12	26	Sama	0,5—3,0	Sama
25	69	Ümmargune	1,0—3,0	Kollakas
20	45	Sama	1,0—3,0	Sama
28	68	Sama	1,0—3,0	Sama
23	10	Sama	1,0—2,0	Valge
18	4	Sama	1,0—2,0	Sama
28	12	Sama	1,0—2,0	Sama
19	7	Sama	2,0—4,0	Kollakas-valge
32	7	Ümmargune	3,0—6,0	Pruunikas-valge
26	26	Nuiakujuline	4,0—6,0	Punakas-pruun

1	2	3	4	5	6	7
Astragalus glycyphyllus	Rakvere raj., Kulina, puisniidu nõlv	Kg	sl	5,7	1,0	4
	Kingissepa raj., Viidumäe, kuuse-segamets	Lk_I	sl	5,0	1,5	5
Oxytropis pilosa	Kingissepa raj., Viidumäe, männimets	K″	l	7,4	2,5	5
Onobrychis vicifolia	Kingissepa raj., Kuusnõmme mõis, põlluserv	Kg	ls	7,1	5,5	9
Vicia tetrasperma	Harju raj., Männiku, raudteetamm	K″	l	7,4	6,0	2
Vicia cassubica	Kingissepa raj., Viidumäe, metsaserv	Kog	l	6,0	2,5	7
Vicia sylvatica	Rapla raj., Hageri, metsaserv	Kg	ls	7,1	8,5	8
	Rakvere raj., Anguse, kuuse-segamets	L_{II}	l	5,3	13,0	30
	Kingissepa raj., Kaarma, lepik	K_Ig	sl	4,6	1,0	13
Vicia cracca	Haapsalu raj., Laelatu, puisniit	K‴	ls	6,9	2,5	4
Vicia sepium	Harju raj., Harku, puisniit	Kg	l	7,1	2,0	2
Vicia sativa	Rakvere raj., Küti. põld	K″	ls	7,0	> 40,0	34
	Viljandi raj., Pöögle, põld	Lk_{II}	sl	5,1	3,0	9
Vicia faba	Harju raj., Harku, põld	K‴	ls	7,0	5,5	7
Lathyrus odoratus	Harju raj., Harku, aed	K‴	ls	6,7	5,2	6
Lathyrus sylvestris	Rakvere raj., Oandu, teeserv	Lk_I	l	5,8	7,0	4
	Rapla raj., Pajuka mõis, kuuse-segamets	M_2'	t_2	6,1	6,0	14
	Valga raj., Piiri, metsaserv	Ko	ls	7,0	6,0	8
Lathyrus pratensis	Haapsalu raj., Risti, metsaserv	K″	sl	7,1	5,5	13
Lathyrus palustris	Rapla raj., Pajuka mõis, luhaniit	M_2'	t_2	5,5	1,5	5
Lathyrus pisiformis	Rapla raj., Nõmmealuse, puisniit	Kg	sl	7,0	2,0	19
Lathyrus maritimus	Kingissepa raj., Harilaid, mereäär	Ko	l	6,7	1,0	1
Lathyrus vernus	Haapsalu raj., Laelatu, puisniit	Kg	ls	6,9	4,0	8

8	9	10	11	12
40		Mügaraid ei leitud		
46		Mügaraid ei leitud		
27	5	Ümmargune	2,5—4,0	N — valge V — hallikas-valge
31	6	Nuiakujuline	1,0—3,0	N — pruunikas-valge V — pruunikas-must
32	7	Ümmargune ja ovaalne	1,0—3,5	N — valge V — kollakas
43	9	Kepikesekujuline	1,0—2,5	Valge
76	22	Käpakujuline	4,5—7,5	Sama
63	19	Sama	4,5—7,5	Sama
48	9	Sama	4,5—7,5	Sama
41	12	Kepikesekujuline	1,0—2,5	Sama
65	23	Ümmargune ja ovaalne	1,5—4,0	N — valge V — kollakas
69	18	Sama	1,5—4,0	Sama
58	10	Sama	1,5—4,0	Sama
73	20	Ümmargune ja ovaalne	5,0—8,0	N — valge V — kollakas
90	8	Nuia- ja käpakujuline	5,0—6,0	N — valge V — nõrgalt pruunikas
37	5	Ümmargune	3,0—5,5	Valge
49	6	Sama	3,0—4,5	Sama
73	13	Sama	3,0—5,5	Sama
34	5	Sama	0,5—3,0	Sama
37	4	Sama	2,0—4,0	Sama
39	2	Ümmargune- ja nuiakujuline	4,0—5,0	Pruunikas-valge
29	3	Nuia- ja käpakujuline	5,0—6,0	N — valge V — nõrgalt pruunikas
44	26	Nuiakujuline	5,0—6,0	Sama

1	2	3	4	5	6	7
	Rapla raj., Jaani, kuuse-segamets	Ko	sl	6,6	0,5	3
	Rapla raj., Varbola, kuuse-segamets	K_1g	sl	5,7	0,5	10
Lathyrus niger	Haapsalu raj., Viidumäe, raiesmik	Kog	l	6,0	2,5	14
Pisum arvense	Haapsalu raj., Laitse, põld	K‴	ls	7,2	9,0	7
Pisum sativum	Rakvere raj., Põlula, põld	Ko	ls	6,6	30,0	8
Phaseolus vulgaris	Harju raj., Harku, aed	K‴	ls	6,7	5,6	9

Liblikõieliste kõrguse ja nende juuremügarate morfoloogiliste

Liblikõieliste liik	Taimede arv	$r_{TK \times MA}$	$r'_{TK \times MA, MS}$
Lathyrus vernus	30	0,491	0,411
Lathyrus sylvestris	30	0,740	0,777
Trifolium arvense	30	0,650	0,697
Trifolium repens	20	0,555	0,746
Vicia sylvatica	30	0,841	0,841
Vicia sativa	20	0,850	0,807
Ononis arvensis	30	0,812	0,986
Ononis repens	20	0,823	0,847
Lotus corniculatus	30	0,757	0,912
Anthyllis vulneraria	30	0,699	0,670
Medicago lupulina	60	0,545	0,548

r′ — osakorrelatsioonikoefitsiendi väärtus, mille puhul 3. faktori (komaga eraldatud) mõju on välistatud.
* — korrelatsiooni $P < 95\%$.

Tabel 2 (järg)

8	9	10	11	12
46	15	Sama	5,0—6,0	Sama
32	13	Sama	3,5—5,5	Sama
41	23	Ümmargune	1,5—3,0	Valge
62	13	Sama	3,0—5,0	N — valge V — nõrgalt pruunikas
43	14	Sama	3,0—5,0	Sama
48	14	Sama	5,0—6,0	Roosakas

Tabel 3

tunnuste korrelatsioon

$r_{TK \times MS}$	$r'_{TK \times MS, MA}$	$r_{MA \times MS}$	$r'_{MA \times MS, TK}$	$r_{TK \times MM}$
0,531	0,463	0,298*	0,050*	0,600
—0,087*	0,366	—0,420	—0,531	0,600
—0,252*	0,426	—0,729	—0,903	0,243*
0,295*	0,956	—0,365*	—0,253*	0,642
0,146*	—0,141*	0,262*	0,259*	0,674
—0,121*	—0,163*	—0,041*	0,119*	0,644
—0,052	0,395	—0,332*	—0,581	0,556
0,083*	0,356*	—0,142*	—0,371*	0,799
—0,027*	0,779	—0,583	—0,851	0,749
0,558	0,508	0,303*	—0,146*	0,670
0,272	0,283	0,065*	—0,103*	0,453

TK — taimede kõrgus,
MA — mügarate arv,
MS — mügarate suurus,
MM — mügarate maht.

ainult ümmargused ning *Medicago* perekonnas ainult käpakujulised mügarad. (Terminoloogia mügarate kuju kohta on antud autori enda poolt.)

Mügarate kuju huvitas meid kui võimalik abikriteerium mügarbakterite klassifitseerimisel. Selgus aga, et liblikõieliste juurtel leiduvate mügarate morfoloogia varieerub tublisti nii sama perekonna kui ka liigi piirides.

Mõned uurijad (Chen, Thornton, 1940; Virtanen, Laine, 1946) on täheldanud seost mügarate värvuse ja efektiivsuse vahel: punaste värvitoonide korral on mügarbakterite efektiivsus kõrge, pruunide puhul madal.

Mügarate värvus sõltub mügarates leiduvast pigmendist. On kindlaks tehtud järgmisi pigmente: hemoglobiin (punane), holeglobiin (roheline) ja methemoglobiin (pruun) (Pochon, de Barjac, 1960).

Virtanen ja Laine (1946) näitasid, et rohelised ja pruunid pigmendid moodustuvad punasest pigmendist mügarate degeneratsioonistaadiumis. Seda kinnitavad ka meie vaatluste tulemused. Nimelt olid noored mügarad enamasti valged, roosakasvalged ja punakaspruunid, kuid vananedes muutusid nad pruuniks või pruunikasmustaks. Varustades mügarbaktereid hapnikuga, täidab mügarates leiduv hemoglobiin (biokeemiline efektiivsuse kriteerium) hapnikureservuaari ja -ülekandja funktsiooni (Garkavenko, 1962). Mügarate värvuse järgi saab otsustada ka kõrge füsioloogilise aktiivsusega ainete, sealhulgas vitamiini B_{12} sisalduse üle (Levin jt., 1954; Rouate, Lochhead, 1955).

Uurimine näitas, et mügarate hulk liblikõieliste juurtel on korrelatsioonis mulla reaktsiooniga (tabelid 2, 3, 4): mulla madalama pH puhul täheldati samal liblikõieliste liigil märksa vähem juuremügaraid kui kõrgema pH korral. Nii kõikus mügarate arv *Vicia sylvatica*'l 9(pH_{KCl}4,6) ja 22(pH_{KCl}7,1), *Lathyrus sylvestris*'el 5(pH_{KCl}5,8) ja 13(pH_{KCl}7,0), *L. vernus*'el 13(pH_{KCl}5,7) ja 26(pH_{KCl}6,9), *Lotus corniculatus*'el 4(pH_{KCl}4,7) ja 12(pH_{KCl}7,0) vahel.

Nagu eespool öeldud, varieeruvad nii mügarate moodustumine kui ka nende arv, suurus ja värvus seoses mulla omaduste muutumisega. Kõige rohkem mügaraid moodustub neutraalse kuni leeleka reaktsiooniga (pH_{KCl}6,8—7,2) lubjarikastes muldades, kus kergesti lahustuvate difosforpentoksiidi- ja kaaliumoksiidisisaldus on kõrge. Nähtavasti on need mügarad ühtlasi kõrge efektiivsusega, mida näitavad nende roosa värvus, taimede suurem kõrgus ja tumeroheline lehestik (tabel 4). Seost mulla pH ja taimede kõrguse vahel näitavad joonis 4 ja tabel 4. Vaatluse all olnud 11 liblikõieliste liigist vastas 8 liigi korral kõrgemale mulla pH-le suurem taimede kõrgus. Eriti hästi tuli ilmsiks niisugune seos *Lathyrus sylvestris*'e pH_{KCl}5,8 (37 cm) ja pH_{KCl}7,0 (73 cm), *Vicia sylvatica* pH_{KCl}4,6 (48 cm) ja pH_{KCl}7,1 (76 cm), *Vicia sativa* pH_{KCl}5,1 (58 cm) ja pH_{KCl}7,0 (69 cm) puhul. *Lathyrus vernus*'el aga ei olnud need suurema pH-ga

mullal kasvavad taimed kõrgemad. Kahel juhul — *Trifolium arvense*'l ja *Medicago lupulina*'l — jäi mulla pH suurenedes taimede kõrgus samaks.

Korrelatsioon- ja osakorrelatsioonarvutused (tabel 3) näitasid, et taimede kõrgus on seoses mügarate arvuga. Suhteliselt tugevam oli seos *Vicia sativa*'l, *V. sylvatica*'l, *Ononis arvensis*'el, *O. repens*'il, *Medicago lupulina*'l ja *Lotus coriculatus*'el. Kõnesoleva korrelatsiooni tugevuses eri perekondade vahel olulisi lahkuminekuid ei esinenud.

Mügarate arvu ja suuruse vahel täheldasime negatiivset korrelatsiooni neljal taimeliigil: *Lathyrus sylvestris*'el, *Trifolium arvense*'l, *Ononis arvensis*'el ja *Lotus corniculatus*'el. Kirjanduse andmed ütlevad, et mida suuremad mõõtmeilt on liblikõieliste juuremügarad, seda vähem neid esineb (Geltser, 1948).

Liblikõieliste taimede ja mügarate vahelise seose paremaks iseloomustamiseks võeti kasutusele veel mõiste «mügarate maht», mis arvutati taimel esinevate mügarate arvu ja nende suuruse alusel. Tabelist 4 selgub, et vaatluse all olnud 11 liblikõieliste liigist esines 10 liigil võrdlemisi tugev seos taime kasvu ja tema juurtel leiduvate mügarate mahu vahel. Ainult *Trifolium arvense*'l selline seos puudus. Ka mügarate mahu ja mulla reaktsiooni vahel täheldasime seost (tabel 4), kusjuures need tulemused olid üldjoontes väga sarnased andmetega, mis saadi liblikõieliste kõrguse ja mulla reaktsiooni vahelise korrelatsiooni arvutamisel.

Liblikõieliste risosfäärist võetud mullaproovide analüüs näitas, et enamikus ja peaaegu eranditult kasvavad liblikõielised kamar-karbonaatmuldadel ja soostunud kamarmuldadel (tabel 2, joonis 3). Seejuures leiti kõige rohkem ja kõige haruldasemad liigid Laelatu puisniidult Haapsalu rajoonis (*Tetragonolobus siliquosus, Ononis arvensis*) ja Viidumäelt Kingissepa rajoonis (*Ononis repens, Trifolium alpestre, Astragalus glycyphyllus, Oxytropis pilosa, Onobrychis viciifolia, Lathyrus maritimus, L. niger, Vicia cassubica*).

Mügarbakterid on mulla reaktsiooni suhtes liigiti erinevate nõuetega. Mõned bakteriliigid võivad taluda võrdlemisi tugevat happelisust (pH 4,9 — ristik, pH 4,7 — vikk, hernes, pH 4,2 — soja, pH 3,2 — lupiin). Kuid sellise kriitilise happelisuse puhul väheneb mügarbakterite arv mullas järsult.

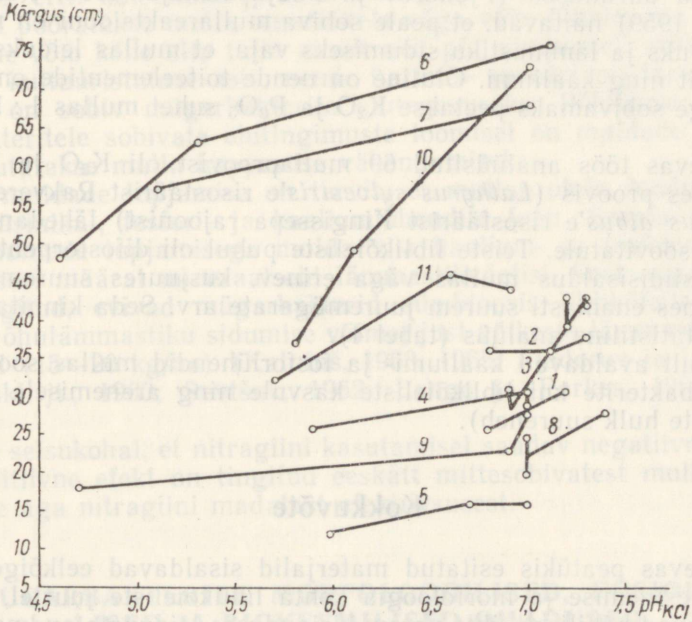
Liblikõieliste 11 liigilt eraldatud mügarbakterid võib suhtumise järgi mulla reaktsioonisse jaotada kahte rühma (joonis 4). Esimese rühma moodustaksid need bakterid, mis kasvavad laias pH piirkonnas. *Vicia sylvatica* juurtel leiti mügaraid mullast, mille pH_{KCl} oli 4,6—7,1, *Lotus corniculatus*'el 4,7—7,0, *Vicia sativa*'l 5,1—7,0, *Lathyrus vernus*'el 5,7—6,9, *L. sylvestris*'el 5,8—7,0, *Trifolium repens*'il 5,9—7,0 ja *T. arvense*'l 6,0—7,0. Teise rühma kuuluksid kitsas pH piirkonnas kasvavad mügarbakterid, mida leiti *Ononis repens*'il pH_{KCl} 6,8—7,2, *O. arvensis*'el pH_{KCl} 6,8—7,3, *Anthyllis vulneraria*'l pH_{KCl} 7,0—7,4 ja *Medicago lupulina*'l pH_{KCl} 6,9—7,3 puhul.

Tabel 4

Juuremügarate morfoloogiliste tunnuste ja mulla agrokeemiliste omaduste korrelatsioon

Mitteparameetriliste märkide kriteeriumid		$Z_{TK \times pH}$	$Z_{TK \times K_2O}$	$Z_{TK \times P_2O_5}$	$Z_{TK \times K_2O/P_2O_5}$	$Z_{MA \times pH}$	$Z_{MA \times K_2O}$	$Z_{MA \times P_2O_5}$	$Z_{MA \times K_2O\ P_2O_5}$	$Z_{MS \times pH}$	$Z_{MS \times K_2O}$	$Z_{MS \times P_2O_5}$	$Z_{MS \times K_2O/P_2O_5}$	$Z_{MM \times pH}$	$Z_{MM \times K_2O}$	$Z_{MM \times P_2O_5}$	$Z_{MM \times K_2O/P_2O_5}$
Märkide arv	Posit.	17	12	13	9	18	16	16	7	14	11	8	10	18	14	15	8
	Negat.	5	10	9	13	4	6	6	15	8	11	14	12	4	8	7	14
Korrelatsiooni tõenäosus P		>95	<95	<95	<95	99	95	95	<95	<95	<95	<95	<95	99	<95	<95	<95

Andmed on esitatud tabelis 3 nimetatud 11 taimeliigi kohta. Tulemusi, kus korrelatsiooni $P < 95\%$, ei loeta usaldusväärseks. Mitteparameetriliste märkide kriteeriumi (Z) indeksite seletust vt. tabelist 3.



Joonis 4. Taimede kõrguse sõltuvus mulla reaktsioonist. *1 — Ononis repens, 2 — Ononis arvensis, 3 — Medicago lupulina, 4 — Trifolium repens, 5 — Trifolium arvense, 6 — Vicia sylvatica, 7 — Vicia sativa, 8 — Anthyllis vulneraria, 9 — Lotus corniculatus, 10 — Lathyrus sylvestris, 11 — Lathyrus vernus.*

Siit ilmneb, et mulla pH suhtes kõige tundlikumad on *Medicago, Ononis*'e ja *Anthyllis*'e liigil ning kõige resistentsemad *Vicia, Trifolium*'i, *Lathyrus*'e ja *Lotus*'e liigil arenevad mügarbakterid.

Jenseni (1943 — tsit. Pochon ja de Barjac, 1960) andmetel on mullas elunevad mügarbakterid sümbioosis peremeestaimega elunevatest mügarbakteritest madala pH suhtes tundlikumad.

Kuigi mügarbakterid võivad areneda ja moodustada mügaraid küllaltki madalate pH väärtuste puhul, ei tähenda see veel, et nad neis tingimustes on võimelised siduma õhulämmastikku. Vastupidi, on teada, et happelistes muldades ei ole mügarbakterid võimelised siduma molekulaarset lämmastikku või seovad seda väga vähesel määral. Nii leidis Virtanen (1928), et ristiku ja herne mügarbakterid kasvavad mullas küll pH 4,0 korral, kuid nad ei seo õhulämmastikku, kui pH $<$ 5,0. Jenseni (1948) andmetel võib ristik siduda molekulaarset lämmastikku mullas, mille pH on 4,2—4,5, kuid väiksema intensiivsusega kui pH 6,8—7,3 puhul.

Arvukad uurimused (Fjodorov ja Podjapolskaja, 1950; Rassel, 1955; Petrosjan, 1959) näitavad, et peale sobiva mullareaktsiooni on mügarbakterite kasvuks ja lämmastiku sidumiseks vaja, et mullas leiduks küllaldaselt fosforit ning kaaliumi. Oluline on nende toiteelementide omavaheline suhe. Kõige sobivamaks peetakse K_2O ja P_2O_5 suhet mullas 1 : 1,72 (Geltser, 1948).

Käesolevas töös analüüsitud 69 mullaproovist oli K_2O ja P_2O_5 suhe ainult kahes proovis (*Lathyrus sylvestris*'e risosfäärist Rakvere rajoonist ja *Melilotus albus*'e risosfäärist Kingissepa rajoonist) lähedane F. Geltseri poolt soovitatule. Teiste liblikõieliste puhul oli difosforpentoksiidi- ja kaaliumoksiidisisaldus mullas väga erinev, kusjuures suurema sisaldusega kaasnes enamasti suurem juuremügarate arv. Seda kinnitab ka meie andmete statistiline analüüs (tabel 4).

Järelikult avaldavad kaaliumi- ja fosforiühendid mullas soodsat mõju nii mügarbakterite kui liblikõieliste kasvule ning arenemisele (viimastel kõrvaljuurte hulk suureneb).

Kokkuvõte

Käesolevas peatükis esitatud materjalid sisaldavad eelkõige andmeid mügarate esinemise ja morfoloogia kohta liblikõieliste juurtel, kusjuures need langevad põhiliselt ühte varem kirjanduses leiduvate andmetega. Katsetulemuste väljaarvutamine aga võimaldas näidata seoseid ühelt poolt taimede kõrguse, mügarate arvu, suuruse ja mahu ning teiselt poolt mulla agrokeemiliste omaduste vahel, mille kohta seni ilmunud kirjanduses on võrdlemisi vähe andmeid. Samuti püstitati uusi oletusi põhjuste kohta, millele allub mügarate morfoloogia peremeestaimede juurtel.

Saadud tulemuste najal võib väita, et mügaraid esineb kõigil uuritud liblikõielistel ning nad erinevad üksteisest kuju, suuruse ja arvu poolest. Erinevused on tingitud ühelt poolt liblikõieliste perekonnast ja liigist, teiselt poolt mullaerimist, mulla reaktsioonist ning kergesti lahustuvast difosforpentoksiidist ja kaaliumoksiidist. Spetsiaalsete võtete kasutamine katseandmete läbitöötamisel võimaldas kindlaks teha mõningaid üldisi tendentse, mis lubavad järeldada, et peremeestaimede kasv oleneb juuremügarate arvust nende juurestikul, kusjuures mügarate arv omakorda on korrelatsioonis mulla reaktsiooniga ning difosforpentoksiidi- ja kaaliumoksiidisisaldusega mullas.

Mügarbakterid on liigiti mulla reaktsiooni suhtes erinevate nõuetega. Kõige rohkem mügaraid moodustub neutraalse kuni leeleka reaktsiooniga (pH_{KCl} 6,8—7,2) lubjarikastes muldades. Happelistes muldades ei ole mügarbakterid võimelised siduma molekulaarset lämmastikku või seovad seda väga vähesel määral. Viimane asjaolu on küllalt suure praktilise

tähtsusega, eriti kui silmas pidada nitragiini kasutamist meie põldudel. Teatavasti pööratakse mulla omadustele väga vähe tähelepanu. Nitragiini kasutamine võib kõne alla tulla ainult neil põllumuldadel, mille agrofoon (muldade kultuuristatuse aste, nende harimis- ja väetamistase, toitainete sisaldus) on sobiv mügarbakterite elutegevuseks. Põhiliseks meetodiks mügarbakteritele sobivate elutingimuste loomisel on muldade lupjamine, mida kasutatakse mulla happesuse vähendamiseks.

Peale muldade lupjamise on tarvis, et mullas oleks loodud ka optimaalne süsiniku-, fosfori- ja kaaliumiühendite foon. Seepärast on vaja kõrvuti muldade lupjamisega mulda viia kaalium- ja fosforväetisi ning isegi vähesel määral mineraalseid lämmastikväetisi. Sest nagu juba eespool märgitud, evivad mügarbakterid sümbioosis liblikõielistega kõige suuremat õhulämmastiku sidumise võimet just väikeste lämmastikukoguste manulusel (15—20 kg/ha) (Kalninš, 1963, 1965; Fjodorov ja Laslo, 1956; Dorossinski jt., 1960; Ševtšuk, 1962; Lange ja Parker, 1960; Bjälfve, 1963).

Oleme seisukohal, et nitragiini kasutamisel saadav negatiivne või väga väike positiivne efekt on tingitud eeskätt mittesobivatest mulla omadustest, mitte aga nitragiini madalast efektiivsusest.

2. MÜGARBAKTERITE MORFOLOOGILISED, FÜSIOLOOGILISED JA BIOKEEMILISED OMADUSED

Rhizobium'i liigilist klassifikatsiooni on käsitletud peamiselt ökoloogilise omaduse põhjal — võime järgi moodustada mügaraid teatud liblikõieliste juurtel (Krassilnikov, 1949; Bergey, 1957). Vähe tähelepanu on pööratud nende bakterite morfoloogilistele, füsioloogilistele ja biokeemilistele omadustele.

Mitmetes viimastel aastatel ilmunud töödes (Allen, Baldwin, 1954; Jensen; 1958; Smith, 1958; Manil, 1963; Graham, 1964) ei peeta *Rhizobium*'i liikide määramist ainult ökoloogiliste omaduste põhjal õigeks ja ei soovitata sellele kriteeriumile tuginevat nomenklatuuri enam jätkata. Vastasel korral ei saaks mügaraid mittemoodustavaid bakteritüvesid arvata *Rhizobium*'i hulka, kuigi neil on kõik vastavad morfoloogilised, füsioloogilised ja biokeemilised tunnused. Sellisteks bakteriteks võivad olla avirulentsed *Rhizobium*'i tüved. Samuti peab arvestama, et mügarbakterid ei asusta ainult mügaraid liblikõieliste juurtel, vaid neid eluneb mullas ka vabalt. Arvatakse isegi, et liblikõieliste taimede asustamine *Rhizobium*'i poolt on mittespetsiifiline (Rippel-Baldes, 1952; Jakob, 1953).

Seepärast tuleb pidada ökoloogilistest omadustest palju olulisemateks ja määravamateks mikroorganismide morfoloogilisi, füsioloogilisi ning biokeemilisi tunnuseid.

Käesolevas peatükis käsitletud uurimiste eesmärk oli välja selgitada, missugused morfoloogilised, füsioloogilised ja biokeemilised omadused olid meie poolt isoleeritud mügarbakterite tüvedel (Pärsim, 1966, 1967) ning missuguste *Rhizobium*'i liikide hulka nad paigutada olemasolevate klassifikatsioonide järgi.

Metoodika

Uurimiseks kasutati 38 *Rhizobium*'i tüve, millest 33 eraldati autori poolt (Pärsim, 1966, 1967) Eesti NSV eri rajoonides kasvavatelt liblikõielistelt (15 perekonda 33 liiki). Lisaks neile kasutati *Genista, Ornithopus*'e, *Trigonella, Lens*'i ja *Soja* mügaratest eraldatud *Rhizobium*'i puhaskultuure, mis saadi Üleliidulisest Põllumajandusliku Mikrobioloogia Teadusliku Uurimise Instituudist N. M. Lazareva kogust. Töös kasutatud tüved esindasid kõiki Bergey (1957) ja Krassilnikovi (1949) määrajates toodud *Rhizobium*'i liike (*exl. Rh. pschati*). Tüvesid, mille liigilise kuuluvuse kohta neis määrajates andmed puudusid, nimetati vastavate peremeestaimede järgi, millelt nad eraldati.

Rhizobium'i tüved isoleeriti täiskasvanud taimede tervetest juuremügaratest Alleni (1953) metoodika järgi.

Petri tassid võeti 5 korduses.

Söötmena kasutati EBI-s V. Tohveri poolt kasutusele võetud järgmise koostisega põhisöödet (MBP): 0,5 g K_2HPO_4, 1000 ml destilleeritud H_2O, 0,2 g $MgSO_4$, 0,1 g NaCl ja 0,2 $CaCl_2$. Mikroelementide segu Fjodorovi (1951) järgi oli järgmine: 1 ml $FeCl_3$ (jäljed), 5,0 g manniiti, 30 ml pärmivett ja 15,0 g agar-agarit. Kõrvalise mikrofloora kasvu allasurumiseks lisati 10 ml 0,25%-list kongo punase lahust.

Kirjandusest on teada, et lupiin kasvab paremini söötmel, kus manniit või glükoos on asendatud türosiiniga. Seepärast osa tüvesid, mille liigilise kuuluvuse kohta andmed puudusid, kasvatati paralleelselt põhisöötmel manniidiga ja põhisöötmel türosiiniga. Tassid külvimaterjaliga hoiti termostaadis 2 nädalat 28° C temperatuuris. Kahenädalane inkubatsiooniaeg valiti sellepärast, et mõnede liblikõieliste mügaratest eraldatud *Rhizobium*'i tüvede kohta ei olnud teada, kas on tegemist kiiresti või aeglaselt kasvavate mügarbakterikultuuridega.

Eraldatud kultuuride puhtust *Agrobacterium radiobacter*'i ja *A. tumefaciens*'i suhtes kontrolliti nende kasvatamisega söötmetel x_3 (10 g peptooni, 2 g Na_2HPO_4, 0,5 g $MgSO_4$, 0,005 g $FeCl_3$, 0,1 g $CaCl_3$, 0,1 g KH_2PO_4, 15 g agar-agarit, 1000 ml destil. vett) ja LPA (1000 ml lihavett, 10 g peptooni, 5 g NaCl, 15 g agar-agarit). Kasvu puudumine nimetatud söötmetel oli puhtuse kriteeriumiks.

Eraldatud kultuure kontrolliti veel nende valikulise reinokuleerimisega

vastavatele peremeestaimedele, mida kasvatati laboratooriumis kunstliku valguse käes 8—12 nädalat kuni mügarate moodustumiseni.

Sellisel viisil kontrollitud *Rhizobium*'i puhaskultuuridest moodustati muuseum. Säilitussöötme koostis oli järgmine: 800 ml aq. font., 200 ml mullaekstrakti ja 30 ml pärmivett. Järgnevalt kuumutati segu 100° C temperatuurini ja viidi pH 7,4-ni. Sööde filtreeriti, lisati 10 g manniiti ja 15 g agar-agarit ning steriliseeriti autoklaavis rõhul 50 kN/m² 30 minutit.

Eraldatud mügarbakteri kultuuride kolooniate morfoloogilisi omadusi (suurus, kuju, läbipaistvus, värvus) uuriti oa-agaril (100 ml oatõmmist, 10 g sahharoosi, 1 g K_2HPO_4, 0,3 g $MgSO_4$, 15 g agar-agarit), MBP-1 ja MBP-1 kongo punasega, sest sageli on koloonia iseloomul diagnostiline tähtsus mikroobide liigi määramisel.

Kõik eraldatud puhaskultuurid värviti Grami meetodil. Peale seda vaadeldi neid mikroskoobi all.

Mügarbakterite rakkude suurust ja rakkude külge kinnituvate viburite asetust uuriti faasi-kontrastmeetodil valgusmikroskoobiga МБР-3 ja elektronmikroskoobiga ЭМ-7.

Preparaadid mikroskoopilisteks uurimisteks faasi-kontrastmeetodil valmistati *Rhizobium*'i puhaskultuuride suspensioonist, mille kontsentratsioon ei ületanud 1 miljonit bakterirakku 1 liitris.

Elektronmikroskoopilisteks uurimisteks valmistati preparaadid Krissi, Birjuzova ja Zolkoveri (1948) poolt soovitatud tilkdialüüsimeetodil.

Mügarbakterite tüvede proteolüütilise ja redutseerimisvõime määramiseks kasutati põhisöödet želatiiniga ja lakmuspiima. Želatiini veeldamist *Rhizobium*'i tüvede poolt uuriti MBP-1, kuid ilma agar-agarita. Viimase asemel lisati 100 g želatiini 1 liitri söötme kohta.

Saadud segu jäeti seisma mõneks tunniks, et želatiin punduks, ja siis kuumutati kuni želatiini täieliku lahustumiseni. Seejärel steriliseeriti autoklaavis 30 minutit rõhul 50 kN/m². Kirjanduse andmetel želatiini autoklaavis steriliseerida ei saa, sest pärast seda ta ei kalgenduvat (Utjovski, 1961). Meil aga kalgendus. *Rhizobium*'i puhaskultuurid külvati pistega želatiini. Kultuurid hoiti laboratooriumis 18—20° C temperatuuris. Vaatlusi tehti 10 nädala jooksul: kahel esimesel nädalal iga 3 päeva, hiljem 5 ja 7 päeva järel, mil registreeriti muutused kultuuride kasvu iseloomus.

Mügarbakterite võimet muuta keskkonna reaktsiooni uuriti lakmuspiimas. Kultuurid hoiti termostaadis 28° C temperatuuris 8 nädalat. Vaatlusi tehti kahel esimesel nädalal iga 3 päeva, hiljem 5 kuni 7 päeva järel. Vaatlustel jälgiti muutusi keskkonna reaktsioonis lakmuse värvusastme alusel.

Rhizobium'i tüvede fermenteerimisvõimet süsivesikute suhtes uuriti 10 süsivesikul: 3 monosahhariidil (arabinoos, glükoos, galaktoos), 3 disahhariidil (sahharoos, laktoos, maltoos) ja 4 mitmealuselisel alkoholil (mannitool, sorbitool, inositool, dultsitool).

Uurimised toimusid nii tardsöötmel (I seeria) kui ka vedelsöötmel

(II seeria). Söötmena kasutati EBI põhisöödet MBP. Süsivesikuid lisati põhisöötmele arvestusega, et iga söötmevariant sisaldaks uuritavat süsinikuühendit 0,05 mooli liitri kohta.

I katseseerias uuriti mügarbakteritest tingitud muutusi ja nende muutuste seaduspärasusi 8 nädala jooksul. Selleks lisati eespool loetletud söötmevariantidele 1 liitri söötme kohta 15 g agar-agarit ja 10 ml 0,5%-list broomtümoolsinise piirituslahust. Saadud «keskkond» võeti neljas korduses à 10 ml katseklaasidesse ja steriliseeriti autoklaavis 30 minutit rõhul 50 kN/m^2. Kolme- (kiiresti kasvavad) ja viiepäevased (aeglaselt kasvavad) *Rhizobium*'i puhaskultuurid külvati katseklaasidesse kaldagarile. Kultuure hoiti termostaadis 28° C temperatuuris. Vaatlused toimusid kahel esimesel nädalal iga 2 päeva, hiljem 3 ja 5 päeva järel. Muutused keskkonna reaktsioonis registreeriti indikaatori värvusastme alusel 9-pallilises süsteemis.

II katseseeria eesmärk oli mõõta süsivesikute fermentatsioonil tekkinud happe hulka. Söötmevariandid (indikaatorita ja agar-agarita) à 50 ml asetati Erlenmeyeri kolbidesse (korduste arv kolm) ja steriliseeriti autoklaavis 30 minutit rõhul 50 kN/m^2. Seejärel külvati igasse kolbi 1 ml *Rhizobium*'i puhaskultuuri. Et kõik kolvid sisaldaksid võimalikult ühepalju bakterirakke, selleks kasvatati bakterite emakultuurid ja vahetult enne infitseerimist määrati neis nefelomeetri ning Gorjajevi kambri varal bakterite tiiter. Kolvid kultuuridega asetati kaheks nädalaks termostaati, kus temperatuuri hoiti 28° C. Seejärel määrati tekkinud hapete hulk potentsiomeetrilisel tiitrimisel 0,01 n NaOH-lahusega.

Kontrollina kasutati kummaski katseseerias niisamuti kolmes või neljas korduses vastavaid infitseerimata söötmevariante.

Katsetulemused töötati statistiliselt läbi ja tehti dispersioonanalüüs, kusjuures keskmistevahelisi erinevusi võrreldi Duncani testiga (Weber, 1961).

Uurimistulemused

Mügarbakterite kasv erinevatel söötmetel, želatiinis ja lakmuspiimas

Eraldatud mikroobide kultuuri klassifitseerimiseks ja identifitseerimiseks ning nende puhtuse kontrollimiseks on vaja baktereid üksikasjaliselt uurida. Mikroobi iseloomustavad kõige paremini morfoloogilised, füsioloogilised ja biokeemilised näitajad, mis võimaldavad teha järeldusi tema omaduste ja arenguastme kohta.

Uurimistulemused vaatluse all olnud mügarbakteri tüvede morfoloogiliste ja füsioloogiliste omaduste kohta on esitatud tabelites 5—12 ja joonistel 5—11.

Kultuurid, mis olid isoleeritud ühe taimeperekonna liikidelt, varieeru-

sid tunnustelt vähe ja nende üldine sarnasus ei võimaldanud neid rühmitada mitte niivõrd üksikute liikide, kuivõrd perekondade kaupa. Eri tüvede reaktsioon kasvatamisel söötmetel x_3 ja LPA on toodud tabelites 5 ja 6. Neid söötmeid kasutati esialgseks puhtuse kontrolliks, et välja selgitada võimalikku saastumist teiste mikroorganismidega, sest on teada, et *Rhizobium*, välja arvatud *Rh. meliloti*, ei kasva LPA-l üldse või kasvab nõrgalt mõnes kohas, samal ajal kui *Agrobacterium radiobacter* kasvab jõuliselt kogu söötmel.

Nagu tabelist 5 nähtub, andsid LPA-l kasvu 38 uuritud bakteritüvest ainult 11 tüve, kusjuures viimastest 6 kuulusid *Rhizobium meliloti* hulka. Iga nimetatud bakteritüvi moodustas LPA-l 4.—5. päeval pärast inkubatsiooni ümmargusi alt laienevaid hallikasvalge limase konsistentsiga kolooniaid. Kolooniate suurus kõikus 2—4 mm vahel. Ülejäänud 5 tüvest kuulus üks *Rh. leguminosarum*'i ja üks *Rh. trifolii* hulka ning üks tüvi oli eraldatud *Astragalus danicus*'elt ja üks tüvi *Ononis repens*'ilt. Nende kahe viimase tüve arvamise kohta *Rhizobium*'i liigiks andmed puuduvad.

Tüved, mis olid eraldatud *Vicia sylvatica*'lt, *Lathyrus sylvestris*'elt ja *Trifolium hybridium*'ilt, andsid söötmel väikesed poolläbipaistvad hallikasvalged ümmargused kolooniad. Algul peeti neid erinevusi üksikuteks juhuslikeks kõrvalekaldumisteks, hiljem aga, kui need andmed kõrvutati mullaproovide analüüsi tulemustega, tuli ilmsiks huvitav seaduspärasus. Kõik need tüved olid isoleeritud taimedelt, mis kasvasid leeleka reaktsiooniga muldadel (pH_{KCl} mitte alla 7,0). Selle seose kontrollimiseks tehti lisakatse *Vicia sylvatica*'lt ja *Lathyrus sylvestris*'elt eraldatud tüvedega, mis saadi muldadelt, mille pH_{KCl} oli 4,6 ja 5,8. Nende tüvede korral aga kasv puudus. Seega võib järeldada, et on olemas mingi seos mulla reaktsiooni ja kolooniate kasvu vahel söötmetel LPA ning x_3.

Ononis repens'ilt isoleeritud tüvi andis hallikasvalged poolläbipaistvad limase konsistensiga kolooniad. Samasugused kolooniad moodustas ka *Astragalus danicus*'elt eraldatud tüvi, erinedes eelmisest vaid nõrgema kasvuintensiivsuse poolest. Üldjoontes oli nende 2 tüve kasvu iseloom väga sarnane *Rh. meliloti* hulka kuuluvate tüvede kasvuga, erinedes viimastest ainult kolooniate mõõtmetelt (väiksemad). Siit võib teha esialgse oletuse nende 2 tüve kuuluvuse kohta *Rh. meliloti* hulka.

Analoogilised tulemused saadi ka *Rhizobium*'i tüvede kasvatamisel x_3-l (tabel 6), ainult selle vahega, et sellel söötmel moodustas kolooniaid ka *Vicia sepium*'ilt eraldatud tüvi (pH_{KCl} 7,1).

Täiendavat informatsiooni üksikute tüvede poolt moodustatud kolooniate kasvu iseloomu kohta võimaldab saada pallisüsteem. Hinne «0» tähendab tüve mittekasvamist antud söötmel, hinne «1» — koloonia väga nõrka kasvu, hinne «2» — koloonia nõrka kasvu, hinne «3» — koloonia keskmist kasvu, hinne «4» — koloonia mõõdukat kasvu.

Pallide võrdlemisel ilmneb, et kõige parema kolooniate kasvu (kasvu

intensiivsus 4 palli) andsid LPA-1 *Medicago sativa*'lt, *M. lupulina*'lt ja *Trigonella*'lt eraldatud tüved ning x_3-l *M. lupulina*'lt, *Melilotus albus*'elt ja *M. dentatus*'elt isoleeritud tüved. Väga nõrga kolooniate kasvu (kasvu intensiivsus pall 1) andsid *Vicia sylvatica*'lt, *V. sepium*'ilt, *Lathyrus sylvestris*'elt ja *Trifolium hybridium*'ilt eraldatud tüved. Nõrga kuni keskmise kolooniate kasvu (kasvu intensiivsus 2 ja 3 palli) andsid LPA-1 *Med. falcata*'lt, *Mel. albus*'elt, *Mel. dentatus*'elt, *Astragalus danicus*'elt ja *Ononis repens*'ilt eraldatud tüved, x_3-l aga *Med. falcata*, *Med. sativa*, *Trigonella*, *Astragalus danicus*'e ja *Ononis repens*'i tüved. Ülejäänud tüvede korral oli kasvu intensiivsus 0 palli, s. t. kasv puudus täielikult.

Bakterite arengutsükli uurimiseks värviti ühe, kahe ja nelja päeva vanuseid kultuure Grami meetodil. See näitas, et kõik uuritavad bakteritüved olid gramnegatiivsed, ühtlaselt värvuvad pulgakesed. Need uurimised olid vajalikud veel elektronmikroskoopiliste preparaatide valmistamisel. Et meid huvitas bakterirakkude viburite asetus, siis oli vaja, et preparaat sisaldaks võimalikult rohkem liikuvaid bakterirakke.

Erivanuste mügarbakterikultuuride vaatlustes tulid ilmsiks suured erinevused rakkude morfoloogias sõltuvalt nende arenguastmest. Noored, 24-tunnised bakterid olid hästi liikuvad ja ühtlaselt värvunud homogeense protoplasmaga pulgakesed. Kahe päeva vanuste kultuuride puhul moodustasid enamuse vakuoliseerunud, liikumisvõime kaotanud rakud, kuigi võis leida ka mõningaid ühtlaselt värvuvaid rakke. Seega hakkavad bakterirakud üle minema «vöötatud» pulgakeste staadiumi. Nelja päeva vanused mügarbakterikultuurid on vakuoliseerunud ja granuleerunud pulgakesed, mis on kaotanud täielikult liikumisvõime. Leidub ka väikesi kokkoidseid vorme. Kogu populatsiooni arengutsükkel on jõudnud nn. «vöötatud» staadiumi. See vormide varieeruvus on kooskõlas varajasemate uurimisandmetega selle kohta, et mügarbakterid näitavad üles pleomorfismi vastavalt elutsüklile (Thornton, Gangulee, 1926; Lewis, 1938; Bisset, 1952; Fjodorov, 1952; Stapp, Knösel, 1956).

Eeltoodu alusel võib järeldada, et elektronmikroskoopilisteks uurimisteks on kõige sobivamad 24 tunni vanused mügarbakterikultuurid.

Elektronmikroskoopiliste uurimiste tulemused rakkude suuruse ja viburite asetuse kohta on toodud tabelis 7 ja joonistel 5—10.

Nagu tabelist 7 ning joonistelt 5 ja 6 selgub, on kõige suuremad rakud (läbimõõt 0,7—0,9 μm ja pikkus 2,5—3,5 μm) *Lathyrus*'elt, *Vicia*'lt, *Trifolium*'ilt, *Medicago*'lt, *Melilotus*'elt ja *Onobrychis*'elt eraldatud kultuuridel. Viburid on kinnitunud rakkude külge peritrihhaalselt, s. t. asetsevad kogu raku pinnal.

Teise rühma moodustasid *Ph. vulgaris*'elt, *On. repens*'ilt, *Astragalus danicus*'elt, *Oxytropis pilosa*'lt, *Ornithopus sativa*'lt, *Lupinus luteus*'elt, *Genista*'lt ja *Soja*'lt eraldatud keskmise suurusega (läbimõõt 0,5—0,8 μm ja pikkus 1,5—2,5 μm) bakterirakud. Kuuelt viimaselt taimeliigilt isolee-

Rhizobium'i tüvede kasvu iseloom X_3-l

Rhizobium'i tüvi liblikõieliste järgi	Kasvu intensiivsus	Kolooniate iseloom
1	2	3
1. *Vicia sylvatica*	1	Väikesed poolläbipaistvad (1—2 mm) piimjasvalged kolooniad. Ümmargused
2. *Vicia sativa*	0	Kasv puudub
3. *Vicia cracca*	0	Sama
4. *Vicia sepium*	1	Väga nõrk kasv. Väikesed läbipaistmatud, ümmargused kolooniad
5. *Vicia faba*	0	Kasv puudub
6. *Vicia cassubica*	0	Sama
7. *Lathyrus vernus*	0	Sama
8. *Lathyrus niger*	0	Sama
9. *Lathyrus pisiformis*	0	Sama
10. *Lathyrus sylvestris*	1	Nõrk kasv. Hallikasvalged väikesed kolooniad (1—2 mm). Poolläbipaistvad
11. *Lathyrus palustris*	0	Kasv puudub
12. *Lens culinaris*	0	Sama
13. *Pisum sativum*	0	Sama
14. *Trifolium arvense*	0	Sama
15. *Trifolium alpestre*	0	Sama
16. *Trifolium spadiceum*	0	Sama
17. *Trifolium pratense*	0	Sama
18. *Trifolium hybridum*	1	Väga nõrk kasv. Üksikud väikesed poolläbipaistvad kolooniad
19. *Trifolium medium*	0	Kasv puudub
20. *Trifolium fragiferum*	0	Kasv puudub
21. *Phaseolus vulgaris*	0	Sama
22. *Medicago falcata*	3	Keskmine kasv. Kolooniad alt laienevad, piimjasvalged, läbipaistmatud (1—3 mm). Pind läikiv ja sile
23. *Medicago sativa*	2	Kasv eelmisest tüvest veidi nõrgem, muus osas sama
24. *Medicago lupulina*	4	Mõõdukas kasv. Ülejäänud sama
25. *Melilotus albus*	4	Sama
26. *Melilotus dentatus*	4	Sama
27. *Trigonella*	2	Nõrk kasv. Kolooniad poolläbipaistvad, ümmargused, selgesti piiristunud ringitaolise kontuuriga
28. *Onobrychis viciifolia*	0	Kasv puudub
29. *Lotus corniculatus*	0	Sama
30. *Anthyllis vulneraria*	0	Sama
31. *Tetragonolobus siliquosus*	0	Sama
32. *Oxytropis pilosa*	0	Sama

Tabel 5 (järg)

1	2	3
33. *Astragalus danicus*	2	Nõrk kasv. Väikesed hallikasvalged poolläbipaistvad kolooniad
34. *Ononis repens*	2	Sama
35. *Lupinus luteus*	0	Kasv puudub
36. *Ornithopus sativus*	0	Sama
37. *Soja hispida*	0	Sama
38. *Genista*	0	Sama

ritud bakteritüvel oli üks subpolaarne (raku ühte otsa kinnitunud) vibur — monotrihh (joonised 7, 8, 10). Ülejäänud taimeliikide mügarbakteritel olid viburid peritrihhaalsed.

Kõige väiksemad bakterirakud (läbimõõt 0,3—0,6 μm ja pikkus 1,0—1,5 μm) olid eraldatud *Lotus corniculatus*'e, *Anthyllis vulneraria* ja *Tetragonolobus siliquosus*'e juuremügaratest. Ka nendel bakteritel asetsesid viburid kogu raku pinna ulatuses (peritrihhid).

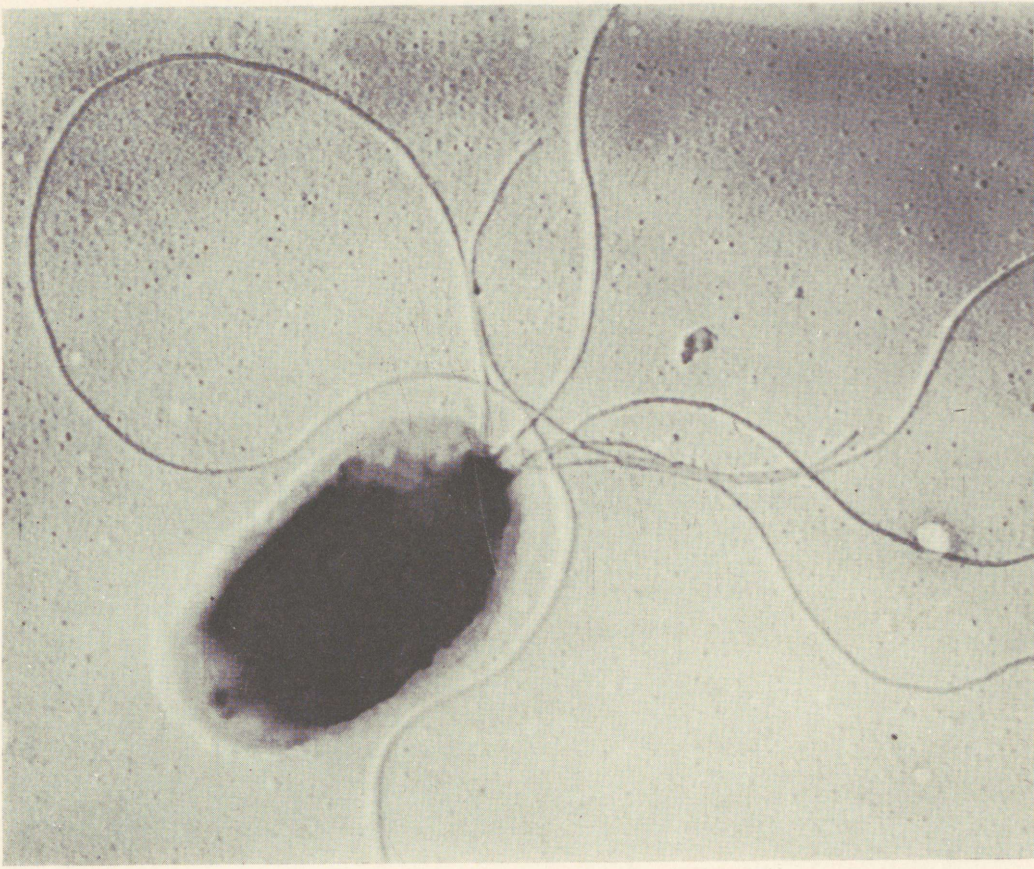
Eeltoodust selgub huvitav asjaolu, et kõigil aeglaselt kasvavatel tüvedel on üks vibur, mis on raku külge kinnitunud subpolaarselt. Tähendab kõik aeglaselt kasvavad bakteritüved on monotrihhid, vastandina kiiresti kasvavatele tüvedele, mille viburid on kinnitunud kogu raku pinnale.

Selle põhjal võib omakorda tõenäoliseks pidada, et viburite asetus on üks kriteeriume, mille alusel võib eraldada aeglaselt kasvavaid tüvesid kiiresti kasvavatest.

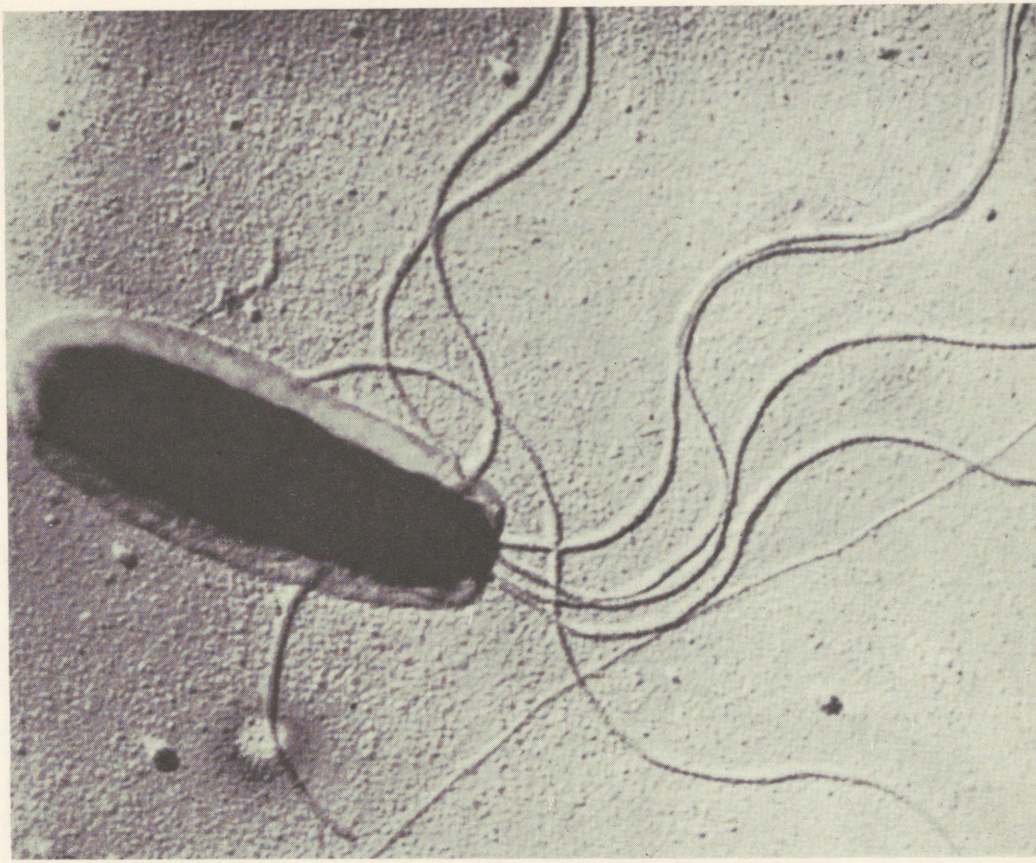
Ühelt poolt on meie tulemused kinnitust leidnud Bergey (1957), Löhnise ja Hanseni (1921) ning Ley ja de Rasseli (1965) töödes, teiselt poolt on aga vastuolus Melkumova (1957) tulemustega. Melkumova andmetel on lutsernilt eraldatud mügarbakteri rakkudel ainult üks subpolaarselt kinnitunud vibur. Seega loeb ta lutserni juuremügaratest eraldatud tüved monotrihhide hulka. Esialgu ei ole aga need tulemused teiste autorite poolt kinnitust leidnud ja neid tuleb pidada vähe põhjendatuks.

Uuritavate *Rhizobium*'i tüvede kolooniate kuju, värvuse ja suuruse kõrval fikseeriti ka nende moodustumise kiirus ning kasvu intensiivsus MBP-l, MBP-l kongo punasega ja oa-agaril. Saadud tulemused on esitatud tabelites 8—10.

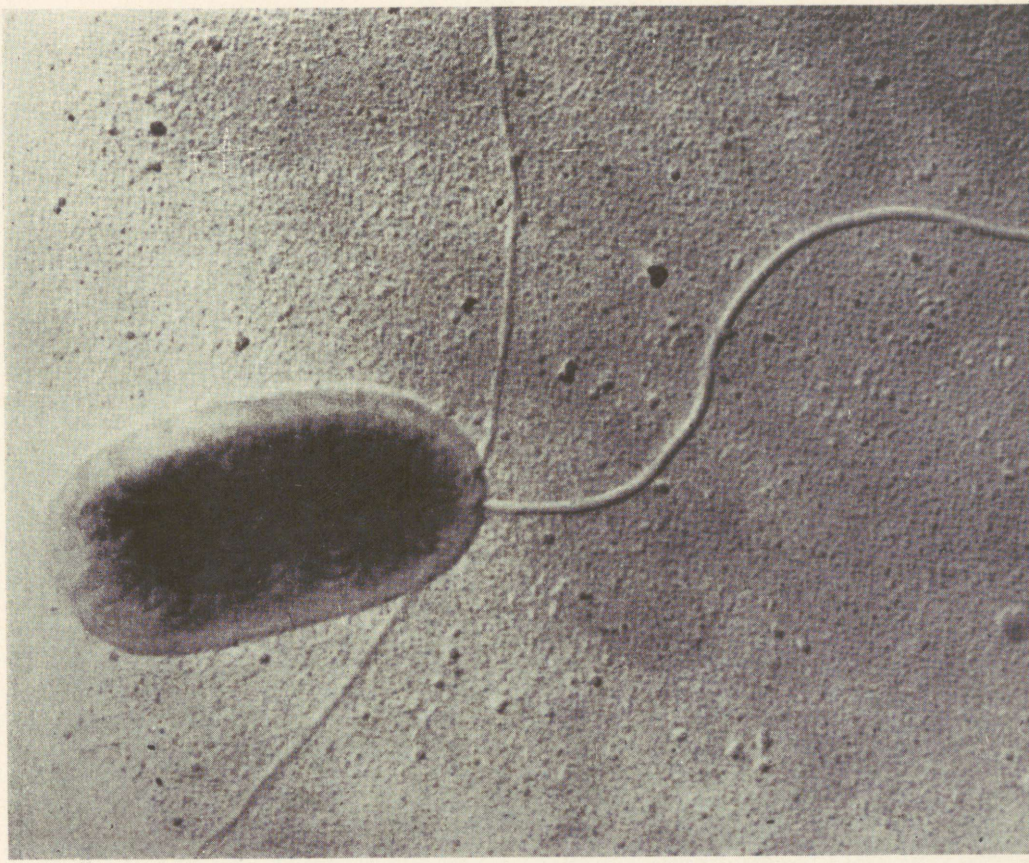
Kolooniate moodustumise kiiruse järgi kunstlikel söötmetel jaotati uuritavad mügarbakterite tüved kahte rühma: kiiresti ja aeglaselt kasvavad. Aeglaselt kasvavateks osutusid *Ornithopus sativus*'e, *Lupinus luteus*'e, *Soja* ja *Genista* juuremügaratest isoleeritud tüved. Ülejäänud 34 tüve kuulusid kiiresti kasvavate hulka, kuid ka siin täheldati teatud erinevusi. Nii andsid *Rh. trifolii* hulka kuuluvad tüved ning *Tetragonolobus*'elt ja *Anthyllis*'elt eraldatud kultuurid lühikese ajaga (3—4 päeva jooksul) kolooniaid.



Joonis 5. *Trifolium arvense*'lt eraldatud mügarbakter. Suurendus 35 300 korda.



Joonis 6. *Vicia sepium*'ilt eraldatud mügarbakter. Suurendus 49 300 korda.



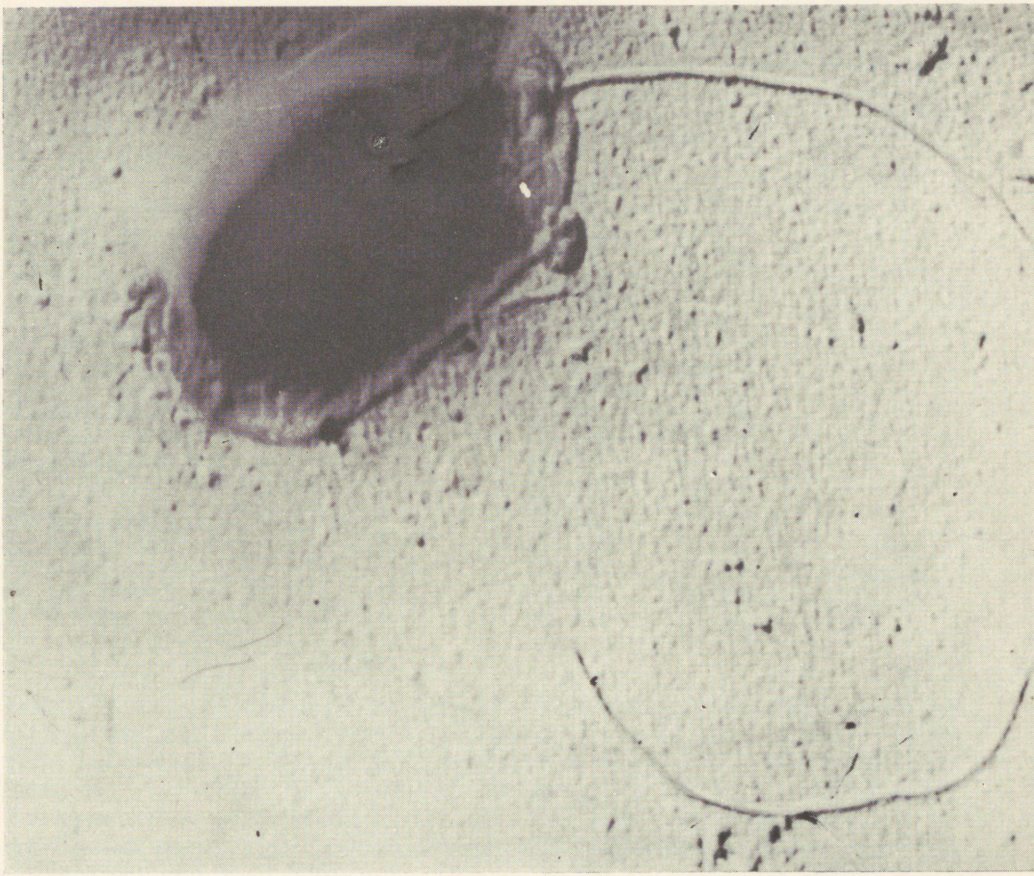
Joonis 7. *Lupinus luteus*'elt eraldatud mügarbakter. Suurendus 42 000 korda.



Joonis 8. *Genista*'lt eraldatud mügarbakter. Suurendus 44 700 korda.



Joonis 9. *Ononis repens*'ilt eraldatud mügarbakter. Suurendus 36 000 korda.



Joonis 10. *Soja hispida*'lt eraldatud mügarbakter. Suurendus 44 700 korda.

Tabel 7

Rhizobium'i tüvede morfoloogiline iseloomustus

Rhizobium'i tüvi	Rakkude läbimõõt mikromeetrites	pikkus	Viburite asetus
1. *Vicia sepium*	0,7—0,9	2,5—3,5	Peritrihh
2. *Vicia faba*	0,7—0,9	2,5—3,5	„
3. *Lathyrus vernus*	0,7—0,9	2,5—3,5	„
4. *Pisum sativum*	0,7—0,9	2,5—3,5	„
5. *Trifolium arvense*	0,7—0,9	2,5—3,5	„
6. *Trifolium hybridum*	0,7—0,9	2,5—3,5	„
7. *Phaseolus vulgaris*	0,5—0,8	1,5—2,5	„
8. *Medicago sativa*	0,7—0,9	2,5—3,5	„
9. *Melilotus albus*	0,7—0,9	2,5—3,5	„
10. *Onobrychis viciifolia*	0,7—0,9	2,5—3,5	„
11. *Lotus corniculatus*	0,3—0,6	1,0—1,5	„
12. *Anthyllis vulneraria*	0,3—0,6	1,0—1,5	„
13. *Tetragonolobus siliquosus*	0,3—0,6	1,0—1,5	„
14. *Oxytropis pilosa*	0,5—0,8	1,5—2,5	„
15. *Astragalus danicus*	0,5—0,8	1,5—2,5	„
16. *Ononis repens*	0,5—0,8	1,5—2,5	„
17. *Lupinus luteus*	0,5—0,8	1,5—2,5	Monotrihh
18. *Soja hispida*	0,5—0,8	1,5—2,5	„
19. *Genista*	0,5—0,8	1,5—2,5	„

Teised tüved aga moodustasid limase konsistensiga kolooniad enamasti 5—8 päeva möödudes. Andmed kolooniate moodustamise kiiruse kohta *Vicia sylvatica*'lt, *V. cassubica*'lt, *Lathyrus vernus*'elt, *L. niger*'ilt, *L. pisiformis*'elt, *Trifolium spadiceum*'ilt, *T. alpestre*'lt, *Melilotus dentatus*'elt, *Tetragonolobus siliquosus*'elt, *Ononis repens*'ilt, *Oxytropis pilosa*'lt ja *Astragalus danicus*'elt eraldatud tüvedest kirjanduses puuduvad ning tuuakse esmakordselt käesolevas töös.

Tabelites 8—10 toodud andmetest ilmneb, et eri liblikõieliste liikidelt eraldatud tüvedest saadud kolooniate iseloomus olulisi erinevusi ei täheldatud. Nii andsid kõik perekonna *Trifolium*'i eri liikidelt eraldatud tüved (7) peaaegu ühesuguseid väikesi kompaktseid poolläbipaistvaid ümmargusi kolooniaid oa-agaril, MBP-1 ja kongo punasega MBP-1. Söötmetevahelised erinevused kolooniate suuruses ja kasvukiiruses tulid eriti hästi ilmsiks MBP-1 kongo punasega. Sellel söötmel kasvanud kolooniad olid MBP-1 ja oa-agaril kasvanud kolooniatest suhteliselt palju suuremad. Ka kasvukiiruses oli vahe. Kui tassides MBP-1 kongo punasega olid kolooniad juba 3. päeval pärast külvi hästi selgesti nähtavad, siis MBP-1 ja oa-agaril hakkasid nad alles ilmuma ning saavutasid samasuguse arenguastme alles 5.—7. päeval.

Tabel 8

Rhizobium'i tüvede kasvu iseloom MBP-l

Rhizobium'i tüved liblikõieliste järgi	Kasvu intensiivsus	Kolooniate iseloomustus
1	2	3
1. *Vicia sylvatica*	4	Kompaktne, ümmargune, selgepiirilise ringitaolise kontuuriga. Pind sile. Hallikasvalge. Ø 2,0—4,0 mm
2. *Vicia sativa*	4	Sama. Ø 2,0—5,0 mm
3. *Vicia cracca*	3	Sama. Ø 2,0—4,0 mm
4. *Vicia sepium*	4	Sama.
5. *Vicia faba*	4	Homogeenne, poolläbipaistev, hallikasvalge. Pind läikiv. Ø 2,0—2,6 mm
6. *Vicia cassubica*	3	Sama. Ø 2,0—4,0 mm
7. *Lathyrus vernus*	4	Ühtlane, ümmargune, selgestipiiristunud ringitaolise kontuuriga. Pind läikiv. Piimjasvalge. Ø 2,0—5,0 mm
8. *Lathyrus niger*	3	Sama
9. *Lathyrus pisiformis*	3	Sama. Ø 2,0—4,0 mm
10. *Lathyrus sylvestris*	4	Sama
11. *Lathyrus palustris*	4	Ümmargune. Pind kumer, läikiv. Poolläbipaistev, hallikasvalge. Ø 2,0—5,0 mm
12. *Lens culinaris*	3	Sama. Ø 2,0—4,0 mm
13. *Pisum sativum*	4	Üksikud suured kolooniad. Ø 4,0—8,0 mm
14. *Trifolium arvense*	3	Homogeenne, ümmargune, ühtlaste äärtega. Hallikasvalge. Ø 1,0—3,5 mm
15. *Trifolium alpestre*	3	Sama
16. *Trifolium spadiceum*	4	Sama. Ø 2,0—5,0 mm
17. *Trifolium pratense*	3	Sama. Ø 1,0—3,0 mm
18. *Trifolium hybridum*	3	Sama
19. *Trifolium medium*	4	Ümmargune, lame. Pind sile, läikiv. Hallikasvalge. Ø 2,0—5,0 mm
20. *Trifolium fragiferum*	2	Kompaktne, kumer, ühtlaste äärtega. Hallikasvalge. Ø 1,5—3,5 mm
21. *Phaseolus vulgaris*	3	Ühtlaste äärtega, kumer. Piimjasvalge. Limase, läikiva pinnaga. Ø 2,0—4,0 mm
22. *Medicago falcata*	3	Hallikasvalge. Ø 1,5—4,5 mm
23. *Medicago sativa*	4	Sama
24. *Medicago lupulina*	4	Sama. Ø 1,0—5,0 mm
25. *Melilotus albus*	4	Homogeenne, ümmargune, ühtlaste äärtega. Poolläbipaistev, hallikasvalge. Pind sile, kumer. Ø 1,5—4,0 mm
26. *Melilotus dentatus*	3	Sama

1	2	3
27. *Trigonella*	3	Kompaktne, ümmargune. Piimjasvalge. ∅ 1,0—2,5 mm
28. *Onobrychis viciifolia*	1	Sama
29. *Lotus corniculatus*	3	Kompaktne, kuplikujuline, selgete piirjoontega. Hallikasvalge. ∅ 2,0—4,0 mm
30. *Anthyllus vulneraria*	4	Sama
31. *Tetragonolobus siliquosus*	4	Sama. ∅ 1,0—5,0 mm
32. *Oxytropis pilosa*	2	Ümmargune, poolläbipaistev, hallikasvalge. Pind kumer, läikiv. ∅ 2,0—4,0 mm
33. *Astragalus danicus*	4	Homogeenne, poolläbipaistev, hallikasvalge. Pind niiske, sile. ∅ 2,0—3,5 mm
34. *Ononis repens*	3	Ümmargune, poolläbipaistev piimjasvalge. ∅ 1,0—3,5 mm
35. *Lupinus luteus*	4	Kompaktne, tihke, ümmargune. Piimjasvalge. Pind opalestseeruv. ∅ 1,0—2,5 mm
36. *Ornithopus sativus*	3	Sama
37. *Soja hispida*	4	Sama
38. *Genista*	4	Sama

Vicia, *Lathyrus*'e, *Lens*'i ja *Pisum*'i juuremügaratest isoleeritud tüved andsid nendel söötmetel samasuguse välimuse ning kujuga kolooniaid, mis erinesid üksteisest ainult suuruselt. Kui *Rh. trifolii* tüvede puhul oli vaid üksikute kolooniate läbimõõt 5—6 mm, siis *Rh. leguminosarum*'i tüvede korral oli enamik kolooniaid sellise läbimõõduga või isegi suuremad (6—10 mm).

Rh. meliloti hulka kuuluvad tüved moodustasid söötmetel poolläbipaistvaid pealt kumeraid hallikasvalgeid limaseid kolooniaid diameetriga 1—6 mm. Ainult *Melilotus dentatus*'elt eraldatud tüvi erines teistest selle poolest, et andis oa-agaril piimjasvalgeid kolooniaid.

Kõik aeglaselt kasvavad tüved andsid väikesi (läbimõõt 0,8—2,0 mm) ümmargusi poolläbipaistvaid kolooniaid. Need kolooniad olid väga tihke konsistensiga ja hästi kleepuvad, mistõttu neid oli külvinõelaga söötme pinnalt väga raske eemaldada. Värvuselt olid nad piimjasvalged, hästi läikiva, opalestseeruva pinnaga. Eriti selgesti ilmnes see kolooniate kasvamisel katseklaasis längagaril.

Ülejäänud tüvedest andsid enam-vähem sarnase pildi kolooniate kasvu iseloomus *Lotus corniculatus*'elt, *Anthyllis vulneraria*'lt ja *Tetragonolobus siliquosus*'elt eraldatud kultuurid. Kõigi nende kolme tüve korral moodustusid ümmargused poolläbipaistvad hästi selgesti piiristunud ringitaoliste

Rhizobium'i tüvede kasvu iseloom MBP-l kongo punasega

Rhizobium'i tüved liblikõieliste järgi	Kasvu intensiivsus	Kolooniate iseloomustus
1	2	3
1. *Vicia sylvatica*	4	Laialivalguv, poolläbipaistev, hallikasvalge. Niiske, läikiva pinnaga. Ø 2,0—5,5 mm
2. *Vicia sativa*	4	Ümmargune, selgepiirilise ringitaolise kontuuriga. Hallikasvalge. Ø 2,0—4,0 mm
3. *Vicia cracca*	3	Sama
4. *Vicia sepium*	4	Sama. Ø 1,5—4,0 mm
5. *Vicia faba*	4	Laialivalguv, poolläbipaistev, hallikasvalge. Ø 2,0—6,5 mm
6. *Vicia cassubica*	3	Homogeenne, ümmargune, selgete piirjoontega. Pind sile, läikiv. Ø 2,0—4,0 mm
7. *Lathyrus vernus*	4	Sama. Ø 2,5—5,5 mm
8. *Lathyrus niger*	3	Sama. Ø 2,0—5,0 mm
9. *Lathyrus pisiformis*	4	Ühtlane. Pind kumer, läikiv. Poolläbipaistev, hallikasvalge. Ø 2,0—4,5 mm
10. *Lathyrus sylvestris*	4	Sama
11. *Lathyrus palustris*	4	Sama
12. *Lens culinaris*	4	Ümmargune, lame, ühtlaste äärtega. Hallikasvalge. Ø 2,0—4,0 mm
13. *Pisum sativum*	4	Laialivalguv, poolläbipaistev, piimjasvalge. Ø 3,0—8,0 mm
14. *Trifolium arvense*	4	Kompaktne, ümmargune, selgesti piiristunud, kontuuriga. Hallikasvalge. Ø 1,0—4,0 mm
15. *Trifolium alpestre*	3	Sama. Ø 1,0—3,5 mm
16. *Trifolium spadiceum*	4	Laialivalguv, poolläbipaistev, hallikasvalge. Pind sile, niiske. Ø 2,0—5,0 mm
17. *Trifolium pratense*	4	Homogeenne, ümmargune, ühtlaste äärtega. Hallikasvalge. Ø 2,0—3,5 mm
18. *Trifolium hybridum*	3	Sama
19. *Trifolium medium*	4	Laialivalguv, lame, sileda, läikiva pinnaga. Hallikasvalge. Ø 2,0—5,0 mm
20. *Trifolium fragiferum*	3	Ühtlaste piirjoontega, ümmargune. Kumera pinnaga. Ø 2,0—4,0 mm
21. *Phaseolus vulgaris*	3	Homogeenne, ümmargune, kuplikujuline. Hallikasvalge. Ø 2,0—4,0 mm

1	2	3
22. *Medicago falcata*	3	Ümmargune, selgesti piiristunud ringitaolise kontuuriga. Poolläbipaistev, hallikasvalge. Pind niiske. Ø 2,0—4,0 mm
23. *Medicago sativa*	4	Sama
24. *Medicago lupulina*	4	Laialivalguv. Hallikasvalge, poolläbipaistev. Ø 2,0—5,0 mm
25. *Melilotus albus*	4	Ümmargune, ühtlaste äärtega. Hallikasvalge, poolläbipaistev. Pind niiske, sile. Ø 2,0—3,5 mm
26. *Melilotus dentatus*	3	Ümmargune, piimjasvalge. Ø 2,0—4,0 mm
27. *Trigonella*	3	Sama
28. *Onobrychis viciifolia*	2	Üksikud väikesed hallikasvalged kolooniad. Ø 1,5—2,5 mm
29. *Lotus corniculatus*	4	Homogeenne, ümmargune, selgete piirjoontega. Hallikasvalge, poolläbipaistev. Läikiva, sileda pinnaga. Ø 2,0—4,0 mm
30. *Anthyllis vulneraria*	4	Sama
31. *Tetragonolobus siliquosus*	4	Sama
32. *Oxytropis pilosa*	3	Ümmargune, hallikasvalge, poolläbipaistev. Pind kuplikujuline, niiske, läikiv. Ø 2,0—4,5 mm
33. *Astragalus danicus*	4	Sama
34. *Ononis repens*	3	Ümmargune, piimjasvalge, poolläbipaistev. Pind kumer. Ø 1,5—3,5 mm
35. *Lupinus luteus*	4	Tihke, ümmargune, piimjasvalge, poolläbipaistev. Opaletseeruva pinnaga. Hästi kleepuv. Ø 1,0—3,0 mm
36. *Ornithopus sativus*	3	Sama
37. *Soja hispida*	4	Sama
38. *Genista*	4	Sama

kontuuridega hallikasvalged kolooniad, kusjuures kolooniate suurus (1—5 mm) oli kõikide teiste kiiresti kasvavate tüvede puhul moodustunud kolooniatest tunduvalt väiksem.

Astragalus danicus'elt ja *Ononis repens*'ilt eraldatud mügarbakterite kultuuri tunnused sarnanesid väga *Rh. meliloti* hulka kuuluvate tüvede tunnustega.

Nagu eespool märgitud, hinnati kolooniate kasvu intensiivsust pallides. Kultuuride kasvu intensiivsuse võrdlemisel ilmnes, et kõige paremini kasvasid (kasvu intensiivsus 4 palli) enamik tüvesid MBP-l kongo punasega: *Rh. leguminosarum*'i 9, *Rh. trifolii* 3 ja *Rh. meliloti* 3 tüve, *Anthyllis vul-*

Rhizobium'i tüvede kasvu iseloom oa-agaril

Rhizobium'i tüved liblikõieliste järgi	Kasvu intensiivsus	Kolooniate iseloomustus
1	2	3
1. *Vicia sylvatica*	4	Homogeenne, ümmargune, selgesti piiristunud ringitaolise kontuuriga. Pind läikiv. Hallikasvalge. ∅ 3,0—6,0 mm
2. *Vicia sativa*	3	Sama. ∅ 3,0—4,0 mm
3. *Vicia cracca*	3	Sama
4. *Vicia sepium*	4	Ühtlane, poolläbipaistev, hallikasvalge. Pind läikiv, niiske. ∅ 2,0—4,0 mm
5. *Vicia faba*	4	Üksikud suured piimjasvalged kolooniad. ∅ 4,0—10,0 mm
6. *Vicia cassubica*	3	Homogeenne, poolläbipaistev, piimjasvalge. Pind kuplikujuline, niiske, läikiv. ∅ 4,0—6,0 mm
7. *Lathyrus vernus*	3	Sama
8. *Lathyrus niger*	3	Sama. ∅ 3,0—5,0 mm
9. *Lathyrus pisiformis*	4	Sama
10. *Lathyrus sylvestris*	4	Ühtlane, ümmargune, selgesti piiristunud kontuuriga. Poolläbipaistev, piimjasvalge. ∅ 3,0—4,5 mm
11. *Lathyrus palustris*	3	Sama. ∅ 2,0—5,5 mm
12. *Lens culinaris*	4	Sama. ∅ 2,0—4,5 mm
13. *Pisum sativum*	4	Ümmargune, läbipaistmatu, piimjasvalge, kumera, läikiva pinnaga. ∅ 3,0—7,0 mm
14. *Trifolium arvense*	3	Homogeenne, ümmargune, ühtlaste äärtega. Poolläbipaistev, hallikasvalge. ∅ 1,0—3,0 mm
15. *Trifolium alpestre*	3	Sama
16. *Trifolium spadiceum*	4	Sama
17. *Trifolium pratense*	2	Sama. ∅ 2,0—6,0 mm
18. *Trifolium hybridum*	4	Homogeenne, hallikasvalge, poolläbipaistev. Pind kumer, läikiv. ∅ 3,0—5,0 mm
19. *Trifolium medium*	3	Sama
20. *Trifolium fragiferum*	2	Homogeenne, ümmargune, poolläbipaistev, hallikasvalge. ∅ 1,0—3,5 mm
21. *Phaseolus vulgaris*	3	Kompaktne, ümmargune, selgete piirjoontega, kuplikujuline. Hallikasvalge. ∅ 2,0—3,5 mm

Tabel 10 (järg)

1	2	3
22. *Medicago falcata*	2	Homogeenne, ümmargune, hallikasvalge, poolläbipaistev. Sileda, limase, läikiva pinnaga. ∅ 1,0—4,0 mm
23. *Medicago sativa*	4	Sama. ∅ 2,0—6,0 mm
24. *Medicago lupulina*	3	Sama
25. *Melilotus albus*	3	Homogeenne, ümmargune, hallikasvalge, poolläbipaistev. ∅ 1,5—2,5 mm
26. *Melilotus dentatus*	3	Homogeenne, läbipaistmatu, piimjasvalge, ümmargune. Pind sile, läikiv. ∅ 2,0—4,0 mm
27. *Trigonella*	3	Üksikud väikesed hallikasvalged kolooniad. ∅ 0,8—2,0 mm
28. *Onobrychis viciifolia*	1	Sama
29. *Lotus corniculatus*	3	Homogeenne, ümmargune, selgesti piiristunud ringitaolise kontuuriga. Poolläbipaistev, hallikasvalge. Pind läikiv, niiske. ∅ 2,0—4,0 mm
30. *Anthyllis vulneraria*	4	Sama
31. *Tetragonolobus siliquosus*	4	Sama. ∅ 1,0—5,0 mm
32. *Oxytropis pilosa*	1	Ümmargune, poolläbipaistev, hallikasvalge, kuplikujuline. Pind limane, niiske, läikiv. ∅ 2,0—4,0 mm
33. *Astragalus danicus*	3	Homogeenne, poolläbipaistev, hallikasvalge. Pealt kumera, läikiva, limase pinnaga. ∅ 1,0—3,5 mm
34. *Ononis repens*	3	Homogeenne, poolläbipaistev, piimjasvalge, ümmargune. Sileda, läikiva pinnaga. ∅ 1,0—3,5 mm
35. *Lupinus luteus*	3	Tihke, ümmargune, poolläbipaistev, piimjasvalge. Opalestseeruva pinnaga. Hästi kleepuv. ∅ 0,8—2,0 mm
36. *Ornithopus sativus*	3	Sama
37. *Soja hispida*	4	Sama
38. *Genista*	4	Sama

neraria'lt, *Tetragonolobus siliquosus*'elt ja *Astragalus danicus*'elt eraldatud mügarbakteri tüved ning kõik aeglaselt kasvavad tüved.

Oxytropis pilosa'lt ja *Onobrychis viciifolia*'lt isoleeritud tüved kasvasid kasutatud söötmel kõige halvemini (kasvu intensiivsus 1 pall). Selline kasvuaste oli ka ainuke kultuuri tunnus, mille poolest need tüved erinesid teistest.

Ülejäänud tüved (13) andsid söötmetel nõrga kuni keskmise kasvu (kasvu intensiivsus 2 ja 3 palli).

Kõigest eeltoodust võib järeldada, et erinevate kultuuride kasv kunstli-

kul söötmel on väga sarnane ning nende määramine üksikuteks *Rhizobium*'i liikideks koloonia kuju, suuruse, värvuse ja läbipaistvuse järgi ei ole võimalik.

Rhizobium'i tüvede kultuuriomadused varieerusid tunduvalt vähem kui nende füsioloogilised ja biokeemilised tunnused. Nii andsid *Rh. meliloti* hulka kuuluvad tüved, mis olid eraldatud *Medicago sativa*'lt, *Med. falcata*'lt, *Med. lupulina*'lt, *Melilotus albus*'elt, *Mel. dentatus*'elt, *Trigonella*'lt ja *Ononis repens*'ilt, lakmuspiimas happelise reaktsiooni (tabel 11). Kuigi algul, s. o. 4.—5. päeval pärast külvi andsid *Medicago*, *Meliloti* ja *Trigonella* perekondadesse kuuluvatelt liikidelt eraldatud bakteritüved aluselise reaktsiooni, toimus 6.—7. päeval lakmuse taandamine ja siis hakkas lakmuspiim muutuma roosakaspunaseks, s. o. keskkonna reaktsioon muutus happeliseks. Happelise keskkonnareaktsiooni, kuid ilma «seerum»-tsooni moodustumiseta, andis *Onobrychis viciifolia*'lt eraldatud tüvi, mis Krassilnikovi määraja järgi moodustab iseseisva *Rhizobium*'i liigi — *Rh. simplex*.

Kõikide teiste perekondade tüved, vaatamata nende kuuluvusele ristinokulatsioonirühma või *Rh.* liikidesse, moodustasid tugeva aluselise reaktsiooni.

Lakmuspiimas kultiveeritud *Lathyrus*'e, *Vicia* (*Rh. leguminosarum*) ja *Trifolium*'i (*Rh. trifolii*) perekondade liikidelt eraldatud tüved erinesid *Melilotus*'e, *Medicago*, *Trigonella* (*Rh. meliloti*) tüvedest selle poolest, et nad põhjustasid leelistumist, mis avaldus algul sinise viiru tekkimises söötme pinnal oleva «seerum»-tsooni servadel ning seejärel kogu söötme järjest intensiivsemas värvumises siniseks.

Ka *Lotus corniculatus*'elt, *Anthyllis vulneraria*'lt ja *Tetragonolobus siliquosus*'elt eraldatud tüved käitusid sarnaselt *Rh. leguminosarum*'i ja *Rh. trifolii* liikide hulka kuuluvate tüvedega. Fred, Baldwin ja McCoy (1932) paigutavad need perekonnad *Lotus*'e ristinokulatsioonirühma.

Ülejäänud perekondade tüved, mis olid eraldatud *Astragalus danicus*'elt ja *Oxytropis pilosa*'lt, kuigi ei ole seotud mingi kindla ristinokulatsioonirühmaga, käitusid sarnaselt ülaltoodud rühmade esindajatega. Nende seos viimastega aga ei pruugi ulatuda kaugemale kui nende reaktsiooni sarnasus lakmuspiimas.

Kõik aeglaselt kasvavad tüved, eraldatud *Lupinus luteus*'elt, *Ornithopus sativa*'lt, *Soja hispida*'lt ja *Genista*'lt, andsid piimale tugeva leelise reaktsiooni, kuid ei moodustunud «seerum»-tsooni. Järelikult on see iseloomulikuks tunnuseks aeglaselt kasvavatele mügarbakterite tüvedele.

Täiesti selge ei ole veel «seerum»-tsooni iseloom. See kujutab endast tsooni lakmuspiima pinnal, mis on läbipaistvam kui lakmuspiim ise ja on nähtavasti tingitud piimas suspendeerunud osakeste settimisest. Et tal on pealiskaudne sarnasus oksüdeeritud vere seismisel moodustuva seerum-

Rhizobium'i tüvede poolt tekitatud reaktsioon lakmuspiimal pärast kuuenädalast inkubatsiooni

Rhizobium'i tüvi / Reaktsiooni tüüp	A	H	A+ST	H+ST
1. *Vicia sylvatica*			+	
2. *Vicia sativa*			+	
3. *Vicia cracca*			+	
4. *Vicia sepium*			+	
5. *Vicia faba*			+	
6. *Vicia cassubica*			+	
7. *Lathyrus vernus*			+	
8. *Lahyrus niger*			+	
9. *Lathyrus pisiformis*			+	
10. *Lathyrus sylvestris*			+	
11. *Lathyrus palustris*			+	
12. *Lens culinaris*			+	
13. *Pisum sativum*			+	
14. *Trifolium arvense*			+	
15. *Trifolium alpestre*			+	
16. *Trifolium spadiceum*			+	
17. *Trifolium pratense*			+	
18. *Trifolium hybridium*			+	
19. *Trifolium medium*			+	
20. *Trifolium fragiferum*			+	
21. *Phaseolus vulgaris*			+	
22. *Medicago falcata*				
23. *Medicago sativa*				+
24. *Medicago lupulina*				+
25. *Melilotus albus*				+
26. *Melilotus dentatus*				
27. *Trigonella*				+
28. *Onobrychis viciifolia*		+		+
29. *Lotus corniculatus*			+	
30. *Anthyllis vulneraria*			+	
31. *Tetragonolobus siliquosus*			+	
32. *Oxytropis pilosa*			+	
33. *Astragalus danicus*			+	
34. *Ononis repens*				+
35. *Lupinus luteus*	+			
36. *Ornithopus sativus*	+			
37. *Soja hispida*	+			
38. *Genista*	+			

A — aluseline reaktsioon ilma «seerum»-tsoonita.
H — happeline reaktsioon ilma «seerum»-tsoonita.
A + ST — aluseline reaktsioon koos «seerum»-tsooniga.
H + ST — happeline reaktsioon koos «seerum»-tsooniga.

tsooniga, siis sellest ongi hakatud nimetama seda tsooni «seerum»-tsooniks.

Ei saa ka lisamata jätta, et lakmuspiima reaktsioon on üks kõige paremaid näitajaid, mille järgi on võimalik otsustada bakterikultuuride puhtuse üle, sest ainult saastaja *A. radiobacter*'i olemasolu korral muutub lakmuspiim pruuniks (Fred jt., 1932, Petrosjan, 1959). Mõnevõrra teistsugused on Megrabjani (1955) andmed, mis on samuti saadud mügarbakterite tüvede redutseerimisvõime uurimisel lakmuspiimas. Tema andmetel on ka esparsetilt eraldatud tüved võimelised muutma lakmuspiima pruuniks. Need andmed ei ole aga kinnitust leidnud ei varajasemates ega hilisemates töödes. Ka meie uurimistulemused kinnitavad oletust, et Megrabjani poolt kasutatud esparseti tüvi ei olnud vaba saastajast *A. radiobacter*'ist ja et seepärast muutus lakmuspiim pruuniks.

Želatiinisse pistega külvamisel olid *Rhizobium*'i kultuurid järgmisel päeval täheldatavad peenikese joonena. Alles hiljem, 5.—6. päeval tulid ilmsiks erinevused kasvu iseloomus, mis on toodud tabelis 12 ja joonisel 11.

Nagu tabelist 12 nähtub, andis üks osa *Rh. leguminosarum*'i hulka kuuluvatest tüvedest (eraldatud *Vicia sylvatica*'lt, *V. cracca*'lt, *Lathyrus vernus*'elt, *L. niger*'ilt, *L. pisiformis*'elt, *L. sylvestris*'elt, *Pisum sativum*'ilt, *Astragalus danicus*'elt ja *Oxytropis pilosa*'lt) külvamisel pistega želatiini algul valge joone, millest hiljem lähtusid perpendikulaarselt peened valged niidikesed, mis söötme pindmises osas olid pikemad, lühenedes katseklaasi põhja suunas. Kasv meenutas ladvaga allapoole pööratud kuusekest (joonis 11, 2).

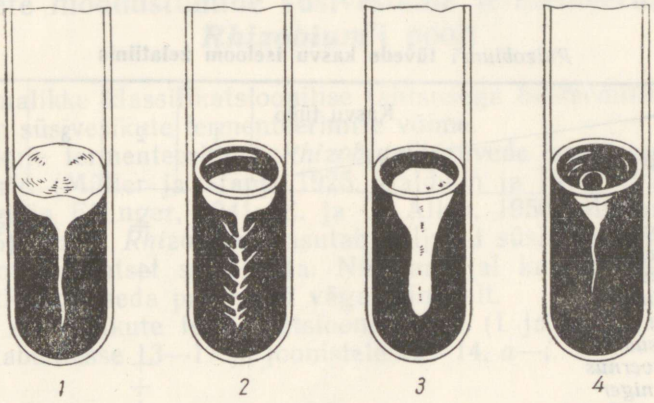
Teine osa *Rhizobium leguminosarum*'i tüvedest (*Vicia sativa*'lt, *V. sepium*'ilt, *V. faba*'lt, *V. cassubica*'lt, *Lathyrus palustris*'elt, *Lens culinaris*'elt) ning osa *Rhizobium trifolii* hulka kuuluvatest tüvedest (*Trifolium arvense*'lt, *T. alpestre*'lt, *T. medium*'ilt, *T. fragiferum*'ilt) andsid kogu söötme ulatuses ülalt alla lindikujulise kasvu (joonis 11, 3).

Ülejäänud *Rhizobium trifolii* hulka kuuluvatest tüvedest, mis olid isoleeritud *Trifolium spadiceum*'ilt ja *T. hybridium*'ilt, andsid želatiinis niidikujulise kasvu, mis söötme pindmises osas oli jämedam, meenutades kraatrit, ning teravnes katseklaasi põhja suunas (joonis 11, 4).

Ka *Onobrychis viciifolia* juuremügaratest eraldatud tüvi andis lindikujulise kasvu (joonis 11, 3), kuid see oli märksa nõrgem kui *Rhizobium leguminosarum*'i ja *Rhizobium trifolii* tüvede kasv želatiinis.

Lupinus luteus'e, *Ornithopus sativus*'e, *Soja hispida* ja *Genista* tüved andsid söötme ülemises osas tugeva kasvu valge tiheda massi näol, mis katseklaasi põhja suunas nõrgenedes moodustas nõelakujulise teraviku (joonis 20, 1).

Želatiini veeldamine mügarbakterite poolt toimus järk-järgult. Nii andsid tüved, mis olid eraldatud *Melilotus*'elt, *Medicago*'lt, *Phaseolus vul-*



Joonis 11. *Rhizobium*'i tüvede kasvu põhitüübid želatiinis. *1* — nõelakujuline, *2* — kuusekujuline, *3* — lindikujuline, *4* — niidikujuline.

garis'elt ja *Ononis repens*'ilt, 5.—8. päeval pärast külvi söötme pinnal veeldunud tsooni. Kaheksa nädala möödumisel oli kogu sööde veeldatud.

Trigonella'lt isoleeritud tüvi želatiini ei veeldanud, kuigi ta kuulub *Rhizobium meliloti* hulka. Ta andis *Rhizobium trifolii* tüvedega sarnase kasvu (joonis 11, 3).

Ka *Lotus corniculatus*'e, *Anthyllis vulneraria* ja *Tetragonolobus siliquosus*'e juuremügaratest eraldatud tüvede korral täheldati pärast neljanädalast inkubatsiooni nõrka želatiini veeldumist söötme ülemises osas. Esimese kolme nädala jooksul andsid nad aga lindikujulise kasvu (joonis 11, 3).

Nagu eeltoodust selgub, on želatiini veeldamisel samuti väga suhteline iseloom, mistõttu mügarbakterite liigi määramisel on ta kõrvalise tähtsusega.

Hiltner (1900), Zipfel (1911) ja Wilson (1917) märgivad, et mügarbakterid ei ole üldse võimelised veeldama želatiini. Teine osa autoreid aga arvab, et eranditult kõik *Rhizobium*'i tüved veeldavad aeglaselt želatiini (Müller ja Stapp, 1925; Petrosjan, 1959). Järelikult ei omista kirjanduse andmed želatiini veeldamisele mügarbakterite liigi määramisel olulist tähtsust. Küll on aga bakterite želatiini lagundamise võimel nende diferentseerimisel liikideks suur tähtsus meditsiinilises mikrobioloogias (Utjovski, 1961).

Tabel 12

Rhizobium'i **tüvede kasvu iseloom želatiinis**

Rhizobium'i tüvi \ Kasvu tüüp	1	2	3	4	Veeldamine
1. *Vicia sylvatica*		+			
2. *Vicia sativa*			+		
3. *Vicia cracca*		+			
4. *Vicia sepium*			+		
5. *Vicia faba*			+		
6. *Vicia cassubica*			+		
7. *Lathyrus vernus*		+			
8. *Lathyrus niger*		+			
9. *Lathyrus pisiformis*		+			
10. *Lathyrus sylvestris*		+			
11. *Lathyrus palustris*			+		
12. *Lens culinaris*			+		
13. *Pisum sativum*		+			
14. *Trifolium arvense*			+		
15. *Trifolium alpestre*			+		
16. *Trifolium spadiceum*				+	
17. *Trifolium pratense*			+		
18. *Trifolium hybridum*				+	
19. *Trifolium medium*			+		
20. *Trifolium fragiferum*			+		
21. *Phaseolus vulgaris*					+
22. *Medicago falcata*					+
23. *Medicago sativa*					+
24. *Medicago lupulina*					+
25. *Melilotus albus*					+
26. *Melilotus dentatus*					+
27. *Trigonella*			+		
28. *Onobrychis viciifolia*			+		
29. *Lotus corniculatus*			+		
30. *Anthyllis vulneraria*					+
31. *Tetragonolobus siliquosus*					+
32. *Oxytropis pilosa*		+			
33. *Astragalus danicus*		+			
34. *Ononis repens*					+
35. *Lupinus luteus*	+				
36. *Ornithopus sativus*	+				
37. *Soja hispida*	+				
38. *Genista*	+				

Hapete moodustumine süsivesikute fermenteerimisel *Rhizobium*'i poolt

Üks võimalikke klassifikatsioonilise tähtsusega biokeemilisi tunnuseid bakteritel on süsivesikute fermenteerimise võime.

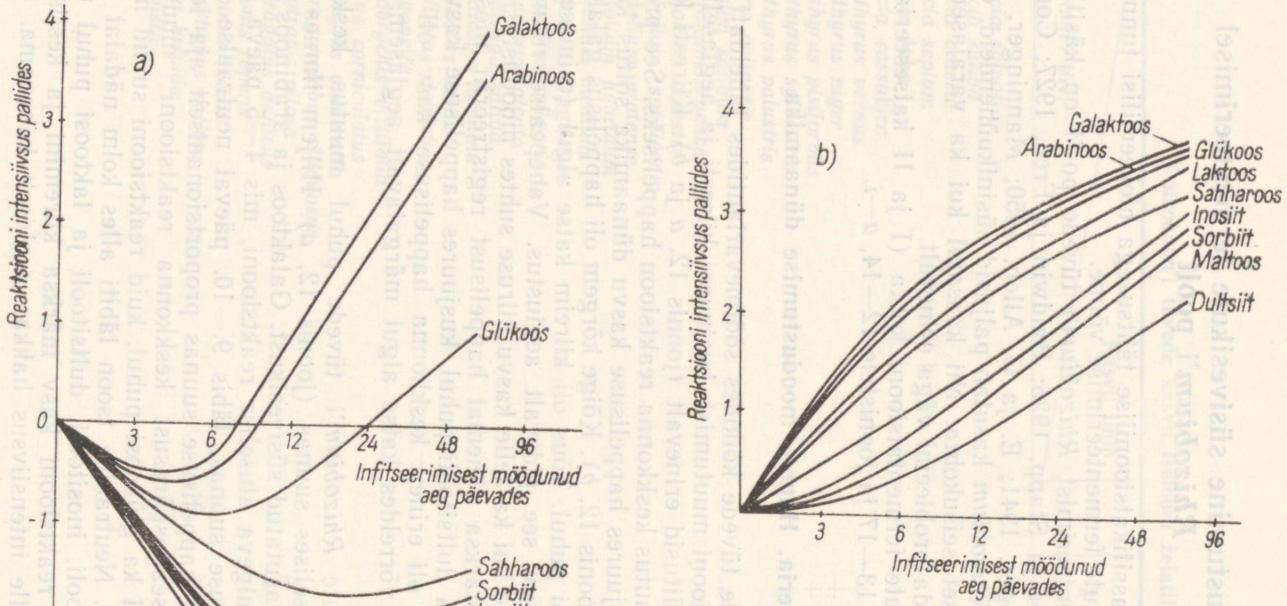
Süsivesikute fermenteerimist *Rhizobium*'i tüvede poolt on käsitlenud paljud autorid (Müller ja Stapp, 1925; Baldwin ja Fred, 1927; Conklin, 1936; Georgi ja Ettinger, 1941; E. ja O. Allen, 1950; Manninger, 1962; Norris, 1965). Kuigi *Rhizobium* kasutab paljusid süsinikuühendeid, ei ole selles küsimuses ühtset seisukohta. Nii kaasajal kui ka varajasemates töödes käsitletakse seda probleemi väga erinevalt.

Andmed süsivesikute fermentatsiooni kohta (I ja II katseseeria) on koondatud tabelitesse 13—17 ja joonistele 12—14, *a*—*i*.

I katseseeria. Hapete moodustumise dünaamika

Rhizobium'i kõikide tüvede kõikides söötmevariantides täheldati pidevat keskkonna reaktsiooni muutumist, kusjuures kiiresti ja aeglaselt kasvavad bakteritüved käitusid erinevalt (joonis 12, *a* ja *b*). Kiiresti kasvavate tüvede korral muutus keskkonna reaktsioon happeliseks. See protsess süvenes pidevalt, kusjuures happelisuse kasvu dünaamika sõltus kasutatavast süsivesikust (joonis 12, *b*). Kõige kõrgem oli happelisus galaktoosi, arabinoosi ja glükoosi puhul. Tõus oli kiireim katse algul (esimese kahe nädala jooksul), hiljem see pidevalt aeglustus. Vahepealse rühma nii keskkonna happelisuse kui ka selle kasvu kiiruse suhtes moodustasid laktoos ja sahharoos. Märksa vähemat happelisust registreeriti inositooli, sorbitooli, maltoosi ja dultsitooli puhul, kusjuures happelisuse kasvu dünaamika katse vältel oli erinev: keskkonna happelisuse kasv oli teiste suhkrute rühmadega võrreldes katse algul märgatavalt aeglasem, katse lõpul aga kiirem.

Aeglaselt kasvavate *Rhizobium*'i tüvede puhul muutus keskkonna reaktsioon algul aluselises suunas (joonis 12, *a*). Hiljem ilmnes selles erinevusi, olenevalt kasutatud süsivesikust. Galaktoos ja arabinoos kutsusid esile aeglaselt kulgeva aluselise reaktsiooni, mis 4—5 päeva pärast tegi pöörde happelisuse suunas, läbis 9.—10. päeval neutraalse punkti ning kasvas edaspidi happelisuse suunas proportsionaalselt aja logaritmiga. Analoogilist seaduspärasust keskkonna reaktsiooni muutumise dünaamikas täheldati ka glükoosi puhul, kuid reaktsiooni suund muutus hiljem, 6.—7. päeval. Neutraalne tsoon läbiti alles kolm nädalat pärast katse algust. Sorbitooli, inositooli, dultsitooli ja laktoosi puhul toimus keskkonna aluselise reaktsiooni kasv märksa kiiremini ja kestis 2—3 nädalat, misjärel selle intensiivsus hakkas aeglaselt kahanema. Sellest



Joonis 12. Keskkonna reaktsiooni muutumine süsivesikute fermenteerimisel a) aeglaselt ja b) kiiresti kasvavate *Rhizobium*'i tüvede poolt. Kõverad on tasandatud libiseva keskmise meetodiga.

rühmast teataval määral erinevalt käitusid sahharoos, mille puhul aluseline reaktsioon kasvas aeglasemalt ning avaldus nõrgemini, ja maltoos, mille puhul aluselise suuna arenemine kestis peaaegu 7 nädalat ja lakkas alles enne katse lõppu.

II katseseeria. Moodustunud hapete hulga määramine

Kõik tüved fermenteerisid kõiki kasutatud süsivesikuid (tabel 13). Viimaste lagunemisel tekkis enamikul juhtudel happeid, harvemini muutus keskkonna reaktsioon aluseliseks, mis sõltus nii *Rhizobium*'i tüvest kui ka kasutatud süsivesikust (tabel 13, joonised 13 ja 14, *a—i*).

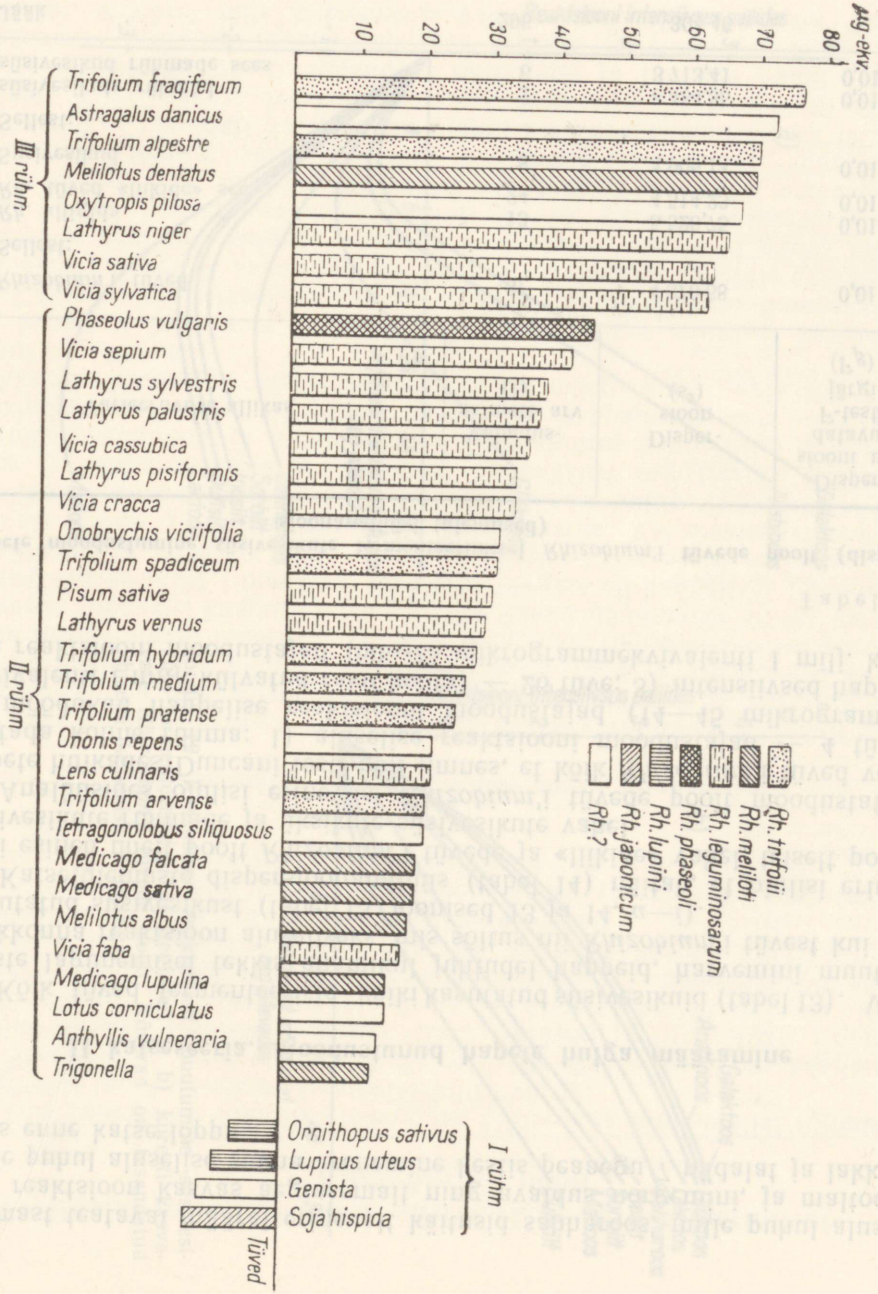
Katsetulemuste dispersioonanalüüs (tabel 14) näitab, et olulisi erinevusi esineb ühelt poolt *Rhizobium*'i tüvede ja «liikide» vahel, teiselt poolt süsivesikute rühmade ja üksikute süsivesikute vahel.

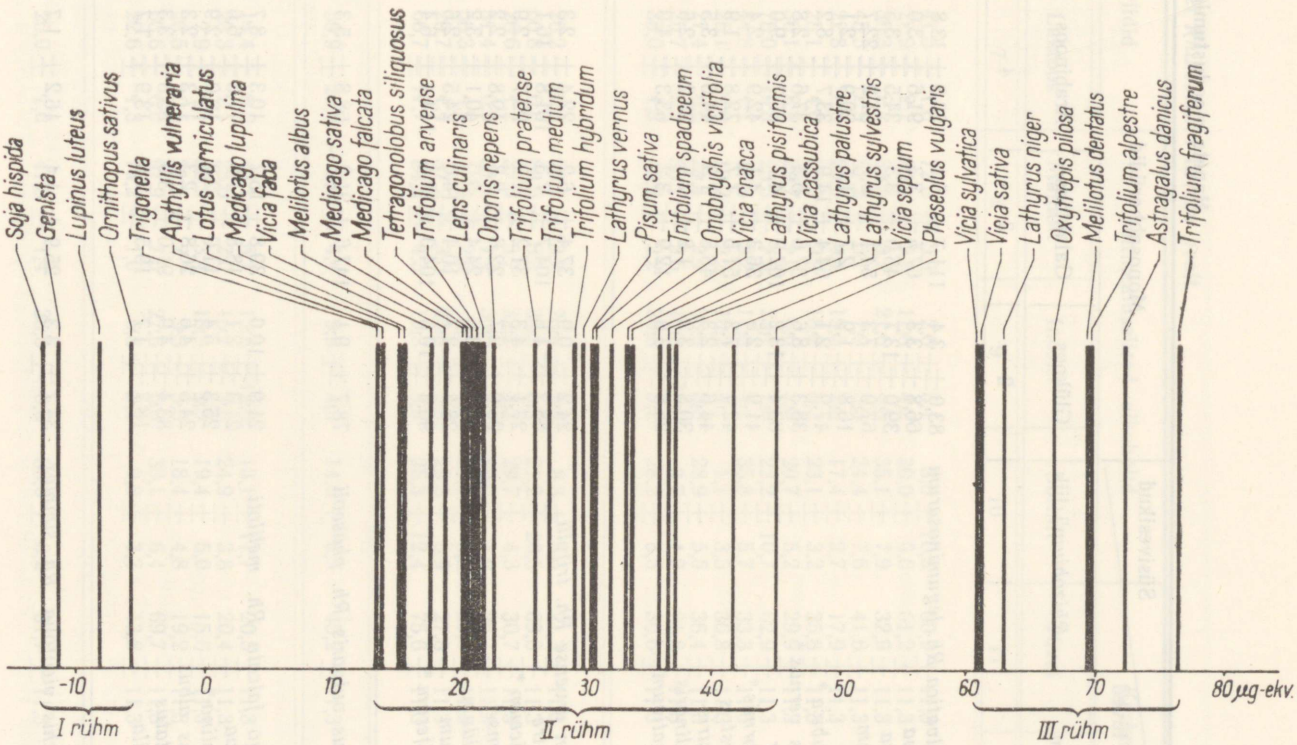
Analüüsides olulisi erinevusi *Rhizobium*'i tüvede poolt moodustatud hapete hulkades Duncani testi abil ilmnes, et kõik *Rhizobium*'i tüved võib jaotada kolme rühma: 1) aluselise reaktsiooni moodustajad — 4 tüve; 2) mõõdukad happelise reaktsiooni moodustajad (14—45 mikrogrammekvivalenti 1 milj. külvatud raku kohta) — 26 tüve; 3) intensiivsed happelise reaktsiooni moodustajad (60—75 mikrogrammekvivalenti 1 milj. kül-

Tabel 13

Hapete moodustumine süsivesikute fermenteerimisel *Rhizobium*'i tüvede poolt (dispersioonanalüüsi tulemused)

Varieeruvuse allikas	Vabadusastmete arv (f)	Dispersioon (s^2)	Dispersiooni usaldatavus F-testi järgi (F_β)
1. *Rhizobium*'i tüved	37	4 870,68	0,01
Sellest:			
Rh. «liigid»	13	5 528,75	0,01
Rh. tüved «liikide» sees	24	4 514,23	0,01
2. Süsivesikud	8	4 906,14	0,01
Sellest:			
süsivesikute rühmad	2	8 484,35	0,01
süsivesikud rühmade sees	6	3 713,41	0,01
3. Jääk	296	304,46	


10
20
30
40
50
60
70
80
µg-ekv.
III rühm
Trifolium fragiferum
Astragalus danicus
Trifolium alpestre
Melilotus dentatus
Oxytropis pilosa
Lathyrus niger
Vicia sativa
Vicia sylvatica
II rühm
Phaseolus vulgaris
Vicia sepium
Lathyrus sylvestris
Lathyrus palustris
Vicia cassubica
Lathyrus pisiformis
Vicia cracca
Onobrychis viciifolia
Trifolium spadiceum
Pisum sativa
Lathyrus vernus
Trifolium hybridum
Trifolium medium
Trifolium pratense
Ononis repens
Lens culinaris
Trifolium arvense
Tetragonolobus siliquosus
Medicago falcata
Medicago sativa
Melilotus albus
Vicia faba
Medicago lupulina
Lotus corniculatus
Anthyllis vulneraria
Trigonella
I rühm
Ornithopus sativus
Lupinus luteus
Genista
Soja hispida
Tüved
Rh. trifolii
Rh. meliloti
Rh. leguminosarum
Rh. phaseoli
Rh. lupini
Rh. japonicum
Rh.?



Joonis 13. Süsivesikute fermenteerimisel *Rhizobium*'i tüvede poolt moodustunud keskmised happe hulgad.

Rhizobium'i tüved / Süsivesikud	Monosahhariidid			
Peremeestaim — *Rhizobium*'i liik	Glükoos	Galaktoos	Arabinoos	Sahharoos
1	2	3	4	5
1. *Vicia sylvatica Rh. leguminosarum*	83,0 ± 3,4	111,7 ± 5,1	126,3 ± 13,8	73,1 ± 4,3
2. *V. sativa*	66,8 ± 3,3	67,5 ± 3,3	91,6 ± 3,0	39,3 ± 3,6
3. *V. cracca*	39,0 ± 13,7	45,0 ± 3,3	34,5 ± 3,5	37,8 ± 10,4
4. *V. sepium*	67,0 ± 7,3	54,1 ± 9,7	51,2 ± 22,7	58,1 ± 1,4
5. *V. faba*	16,8 ± 1,9	2,7 ± 1,5	20,9 ± 2,1	22,5 ± 1,9
6. *V. cassubica* *	47,9 ± 2,1	64,4 ± 14,9	33,7 ± 8,2	39,6 ± 2,6
7. *Lathyrus vernus* *	38,3 ± 8,6	37,6 ± 5,3	37,6 ± 2,8	42,5 ± 1,7
8. *L. niger*	83,4 ± 13,2	102,8 ± 4,7	87,7 ± 9,0	96,6 ± 2,4
9. *L. pisiformis* *	41,9 ± 2,5	36,3 ± 4,1	42,9 ± 2,4	27,0 ± 24,9
10. *L. sylvestris*	42,4 ± 7,3	51,5 ± 1,7	72,8 ± 1,9	88,9 ± 2,2
11. *L. palustris*	44,6 ± 2,3	45,8 ± 1,9	44,5 ± 3,5	43,3 ± 3,2
12. *Lens culinaris*	30,8 ± 3,2	1,8 ± 2,5	28,2 ± 2,6	37,4 ± 1,8
13. *Pisum sativum*	25,5 ± 3,8	12,9 ± 3,2	63,3 ± 4,0	31,8 ± 5,8
14. *Trifolium arvense Rh. trifolii*	24,2 ± 0,9	37,4 ± 6,2	22,4 ± 2,3	10,3 ± 1,5
15. *T. alpestre*	88,2 ± 1,6	104,7 ± 7,3	101,8 ± 16,1	90,5 ± 3,5
16. *T. spadiceum* *	27,1 ± 4,3	31,2 ± 2,2	29,7 ± 2,9	37,8 ± 0,9
17. *T. pratense*	25,0 ± 2,7	22,6 ± 2,3	19,8 ± 2,2	29,3 ± 1,6
18. *T. hybridum*	30,0 ± 3,6	24,4 ± 9,0	40,1 ± 3,2	39,3 ± 1,1
19. *T. medium*	28,8 ± 2,7	10,4 ± 14,0	24,5 ± 2,6	38,0 ± 4,5
20. *T. fragiferum* *	90,8 ± 10,6	104,0 ± 12,4	114,4 ± 6,4	96,3 ± 7,7
21. *Phaseolus vulgaris Rh. phaseoli*	78,7 ± 9,1	147,6 ± 21,2	68,8 ± 5,3	17,4 ± 10,4
22. *Medicago falcata Rh. meliloti*	21,9 ± 10,0	39,8 ± 15,7	10,3 ± 8,7	23,5 ± 2,9
23. *M. sativa*	21,3 ± 2,1	18,8 ± 11,9	17,5 ± 6,6	20,5 ± 1,3
24. *M. lupulina* *	25,3 ± 5,4	11,0 ± 2,3	18,0 ± 2,9	12,3 ± 0,9
25. *Melilotus albus*	24,5 ± 4,6	26,8 ± 2,3	17,3 ± 2,3	17,5 ± 3,9
26. *M. dentatus*	83,4 ± 4,9	91,0 ± 3,9	85,8 ± 3,3	91,0 ± 3,9
27. *Trigonella*	18,7 ± 1,7	19,5 ± 2,0	13,9 ± 1,7	11,6 ± 1,1
28. *Onobrychis viciifolia Rh. simplex*	34,7 ± 3,3	25,9 ± 1,4	16,2 ± 1,7	40,7 ± 0,7

fermenteerimisel *Rhizobium*'i tüvede poolt

Disahhariidid		Mitmealuselised alkoholid			Keskmine	
Maltoos	Laktoos	Manniit	Inosiit	Sorbiit	Tüvel	Liigil
6	7	8	9	10	11	12
28,7 ± 11,4	41,5 ± 1,6	72,6 ± 3,9	2,8 ± 5,1	8,0 ± 10,6	60,9 ± 11,3	
69,6 ± 2,0	77,9 ± 2,7	89,9 ± 2,1	17,8 ± 4,2	30,0 ± 6,0	61,2 ± 11,3	
18,6 ± 3,5	30,3 ± 2,4	34,5 ± 3,7	21,6 ± 4,8	35,1 ± 7,9	32,9 ± 11,3	
14,9 ± 2,6	45,5 ± 12,9	51,2 ± 6,1	7,9 ± 5,3	24,4 ± 7,6	41,6 ± 11,3	
17,3 ± 1,3	22,8 ± 0,8	20,9 ± 4,4	19,5 ± 2,8	17,4 ± 2,7	17,9 ± 11,3	
40,9 ± 20,3	25,1 ± 4,0	29,0 ± 2,9	18,2 ± 5,7	23,1 ± 3,2	35,8 ± 11,3	
26,0 ± 2,5	30,1 ± 2,4	29,7 ± 1,6	6,6 ± 2,9	20,7 ± 5,2	29,9 ± 11,3	
49,5 ± 9,4	75,0 ± 19,5	25,5 ± 7,9	23,1 ± 7,6	22,2 ± 10,7	62,9 ± 11,3	
35,3 ± 1,5	44,8 ± 1,1	17,8 ± 2,2	17,8 ± 4,1	35,8 ± 5,7	33,3 ± 11,3	
29,2 ± 3,4	25,1 ± 7,0	10,2 ± 2,2	10,2 ± 4,1	1,1 ± 3,5	36,8 ± 11,3	
21,9 ± 3,6	27,4 ± 6,6	24,4 ± 2,4	36,9 ± 3,8	28,9 ± 5,5	36,4 ± 11,3	
22,4 ± 2,4	25,7 ± 3,9	36,1 ± 2,6	10,3 ± 11,0	3,7 ± 4,2	21,8 ± 11,3	
11,7 ± 3,4	33,0 ± 1,3	40,2 ± 2,2	28,8 ± 5,1	28,2 ± 8,5	30,6 ± 11,3	38,6 ± 3,1
15,8 ± 2,3	26,2 ± 2,6	20,7 ± 13,7	26,4 ± 9,5	8,3 ± 3,5	21,3 ± 11,3	
42,0 ± 5,7	60,8 ± 6,6	80,6 ± 8,3	38,2 ± 8,9	21,2 ± 20,5	69,8 ± 11,3	
25,3 ± 2,5	26,6 ± 1,2	37,0 ± 3,7	32,2 ± 3,2	29,7 ± 4,3	30,7 ± 11,3	
17,9 ± 1,4	31,4 ± 0,9	31,1 ± 1,4	30,0 ± 3,3	30,0 ± 4,0	26,7 ± 11,3	
16,8 ± 3,9	53,3 ± 4,9	17,8 ± 2,0	9,9 ± 4,4	31,7 ± 5,8	29,3 ± 11,3	
28,1 ± 1,4	29,7 ± 1,4	37,2 ± 3,5	23,8 ± 3,5	29,5 ± 5,9	27,8 ± 11,3	
77,0 ± 3,6	68,7 ± 17,7	84,2 ± 4,3	19,3 ± 8,9	25,3 ± 12,4	75,6 ± 11,3	40,2 ± 4,3
3,3 ± 10,8	59,9 ± 25,0	6,6 ± 4,4	9,9 ± 4,9	14,6 ± 8,5	45,2 ± 11,3	45,2 ± 11,3
5,2 ± 7,9	14,4 ± 8,0	42,1 ± 6,1	13,8 ± 12,6	13,1 ± 11,7	20,5 ± 11,3	
15,1 ± 11,7	23,3 ± 2,1	25,6 ± 2,0	16,7 ± 2,8	24,9 ± 3,8	20,4 ± 11,3	
6,6 ± 1,8	7,9 ± 1,1	20,9 ± 3,4	18,9 ± 4,8	19,4 ± 5,0	15,6 ± 11,3	
13,6 ± 4,6	23,5 ± 10,5	21,5 ± 2,7	9,3 ± 3,3	18,4 ± 4,8	19,2 ± 11,3	
53,3 ± 2,7	63,6 ± 6,0	91,9 ± 7,5	27,8 ± 5,0	39,1 ± 6,4	69,7 ± 11,3	
11,1 ± 1,1	22,6 ± 1,3	10,2 ± 1,0	6,8 ± 2,3	9,8 ± 3,3	13,8 ± 11,3	26,5 ± 4,7
24,5 ± 1,6	25,0 ± 1,0	41,5 ± 1,4	38,5 ± 0,6	38,0 ± 3,2	31,7 ± 11,3	31,7 ± 11,3

1		2	3	4	5
29. *Lotus corniculatus* *	*Rh.*?	17,8 ± 4,4	9,9 ± 2,6	22,0 ± 3,1	18,9 ± 3,9
30. *Anthyllis vulneraria* *	*Rh.*?	15,3 ± 1,2	13,5 ± 4,6	19,9 ± 1,3	16,1 ± 1,5
31. *Tetragonolobus siliquosus* *	*Rh.*?	24,6 ± 2,4	23,9 ± 1,1	31,4 ± 1,6	12,2 ± 1,0
32. *Oxytropis pilosa* *	*Rh.*?	75,9 ± 9,1	83,0 ± 6,1	84,4 ± 5,4	81,6 ± 9,0
33. *Astragalus danicus* *	*Rh.*?	112,8 ± 1,3	91,9 ± 6,7	86,6 ± 6,4	107,8 ± 2,0
34. *Ononis repens* *	*Rh.*?	28,0 ± 2,1	19,6 ± 1,6	27,2 ± 1,9	32,8 ± 2,0
35. *Lupinus luteus*	*Rh. lupini*	16,8 ± 3,7	13,5 ± 3,6	2,7 ± 4,0	—14,4 ± 15,2
36. *Ornithopus sativus*		7,0 ± 4,4	14,4 ± 8,3	10,5 ± 2,2	—10,0 ± 5,1
37. *Soja hispida*	*Rh. japonicum*	—19,7 ± 3,4	1,5 ± 3,0	15,3 ± 4,5	—10,3 ± 6,0
38. *Genista*	*Rh.*?	23,9 ± 6,1	10,5 ± 2,8	7,2 ± 3,3	—14,5 ± 14,3
	Keskmine	40,9 ± 5,6	42,9 ± 5,6	43,2 ± 5,6	37,7 ± 5,6
			42,3 ± 3,2		

* Reinokuleeritud tüved.
** Kahe nädala jooksul vedelsöötmes moodustunud happe hulk (µg-ekv. 1 milj.

vatud raku kohta) — 8 tüve (joonised 13, *a, b*). Tüvedevahelised erinevused rühmade piirides ei ole statistiliselt olulised. Seejuures on huvitav märkida, et aluselise reaktsiooni kutsusid esile eranditult aeglaselt kasvavad *Rhizobium*'i tüved (eraldatud *Lupinus*'elt, *Ornithopus*'elt, *Genista*'lt, *Soja*'lt). Intensiivseteks happe produtseerijateks (kuuel juhul kaheksast) osutusid Saaremaal (muldade pH_{KCl} 6,6—7,4) kasvanud taimedelt eraldatud tüved. Need andmed on kooskõlas Norrise (1965) hüpoteesiga, et happe produtseerimine *Rhizobium*'i tüvede poolt on seotud aluselise pinnasega kohanenud peremeestaimedega. Kahjuks pole võimalik samasuguse kindlusega väita, kas aluselist reaktsiooni tekitanud tüved olid eraldatud vastavalt happelistel muldadel kasvanud taimedelt, kuna just need tüved, nagu märgitud, saadi Leningradist. Kirjandusest (Talts, 1959) on siiski teada, et ka lupiin kasvab hästi võrdlemisi happelistel muldadel.

Tabel 14 (järg)

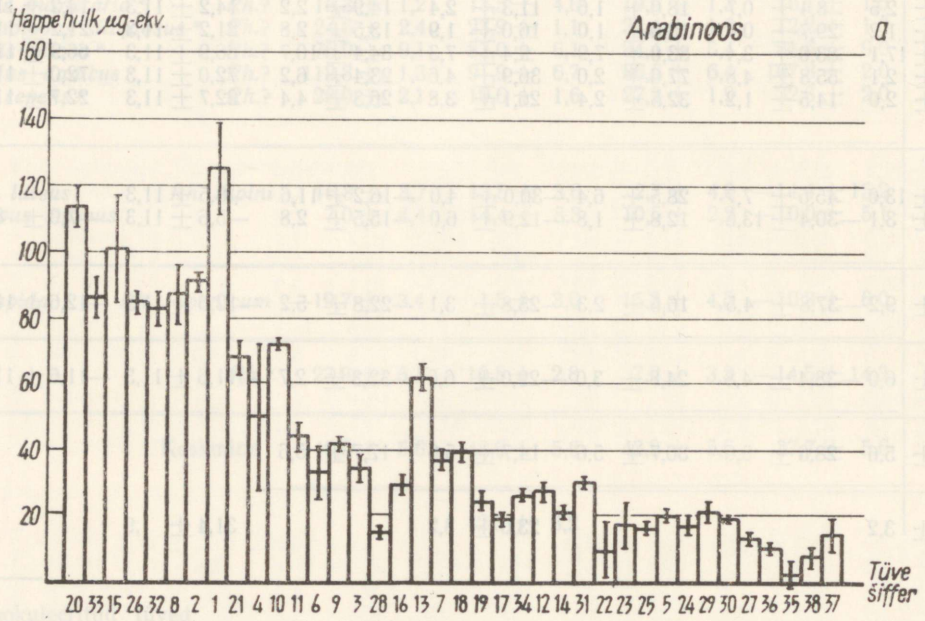
6	7	8	9	10	11	12
10,3 ± 3,4	7,5 ± 4,2	22,2 ± 2,3	13,9 ± 3,6	15,6 ± 5,4	15,3 ± 11,3	15,3 ± 11,3
10,5 ± 2,5	8,4 ± 0,7	18,0 ± 1,6	11,3 ± 2,4	14,9 ± 2,2	14,2 ± 11,3	14,2 ± 11,3
20,8 ± 1,2	29,7 ± 0,6	18,6 ± 1,0	16,0 ± 1,9	13,5 ± 2,8	21,2 ± 11,3	21,2 ± 11,3
66,5 ± 17,1	83,0 ± 3,4	83,0 ± 7,9	9,4 ± 7,3	34,4 ± 10,7	66,9 ± 11,3	66,9 ± 11,3
55,6 ± 2,1	55,8 ± 4,8	77,6 ± 2,0	36,9 ± 4,6	23,4 ± 6,2	72,0 ± 11,3	72,0 ± 11,3
−2,3 ± 2,0	14,5 ± 1,2	32,5 ± 2,4	26,1 ± 3,8	26,3 ± 4,4	22,7 ± 11,3	22,7 ± 11,3
−31,8 ± 13,6	45,6 ± 7,7	28,5 ± 6,4	−30,0 ± 4,0	−16,2 ± 11,6	−8,5 ± 11,3	
−26,0 ± 3,1	−30,4 ± 13,6	12,8 ± 1,8	−12,9 ± 6,0	−15,5 ± 2,8	−5,6 ± 11,3	−7,0 ± 8,0
−30,3 ± 9,2	−37,8 ± 4,5	16,5 ± 2,3	−25,8 ± 3,1	−22,8 ± 5,2	−12,6 ± 11,3	−12,6 ± 11,3
−56,6 ± 6,0	−38,4 ± 4,8	24,8 ± 3,0	−29,0 ± 6,6	−32,3 ± 2,7	−11,6 ± 11,3	−11,6 ± 11,3
20,0 ± 5,6	28,6 ± 5,6	36,7 ± 5,6	14,7 ± 5,6	17,7 ± 5,6		
28,8 ± 3,2			23,0 ± 3,2		31,4 ± 1,9	

külvatud bakteriraku kohta).

Kõik teise rühma kuuluvad tüved, välja arvatud need, mis olid isoleeritud *Phaseolus vulgaris*'elt ja *Ononis repens*'ilt, fermenteerisid kõiki süsivesikuid, kutsudes esile happelise reaktsiooni. Meie katsetulemuste põhjal võis *Phaseolus vulgaris*'elt eraldatud tüvi maltoosil tekitada nii happelise kui ka aluselise reaktsiooni (tabel 13). Seda omadust soovitavad Müller ja Stapp (1925) ning E. ja O. Allen (1950) kasutada nende bakterite diferentseerimiseks teistest *Rhizobium*'i tüvedest. Meie aga leidsime, et ka *Ononis repens*'i tüvi tekitas maltoosil aluselise reaktsiooni.

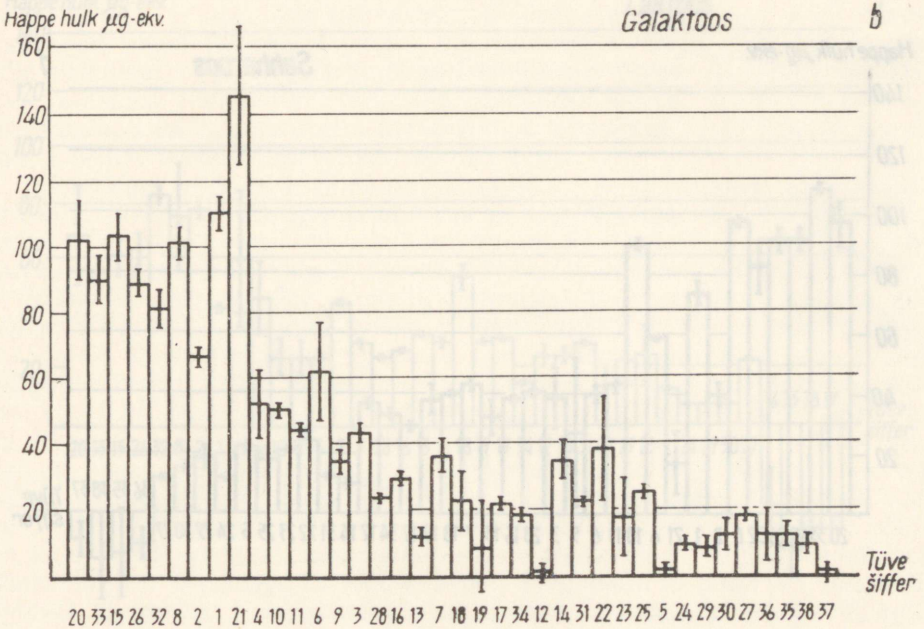
Kolmandasse rühma kuuluvad bakteritüved produtseerisid hapet ainult galaktoosil, arabinoosil, mannitoolil ja glükoosil. Viimasel ei moodustanud hapet *Soja hispida*'lt eraldatud tüvi. Teistel süsivesikutel kutsusid nad esile aluselise reaktsiooni.

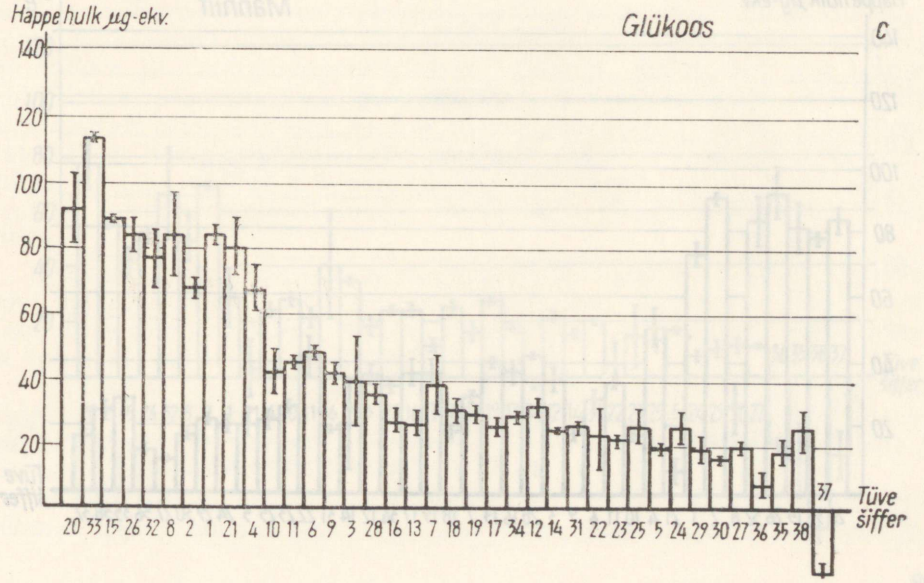
Vastavalt bakteritüvede biokeemilistele omadustele võib teha teravat

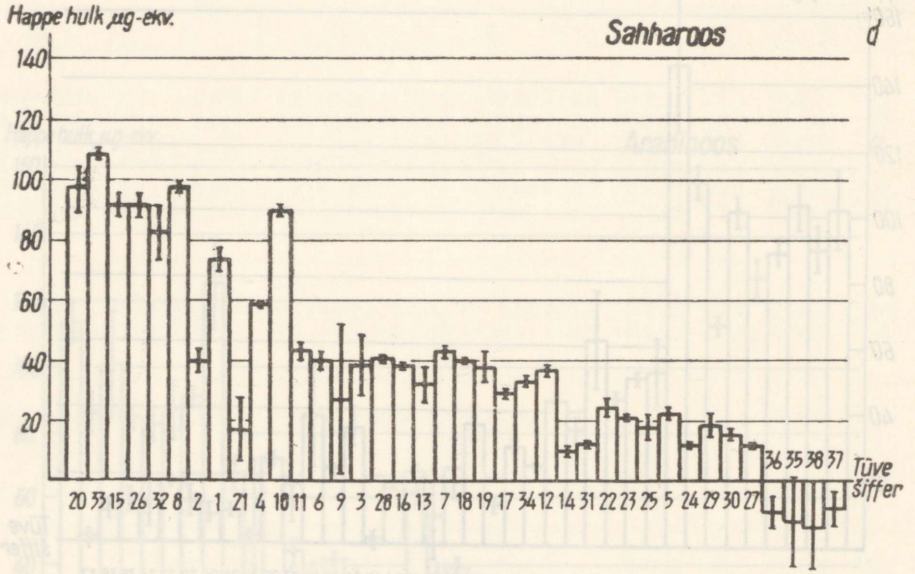


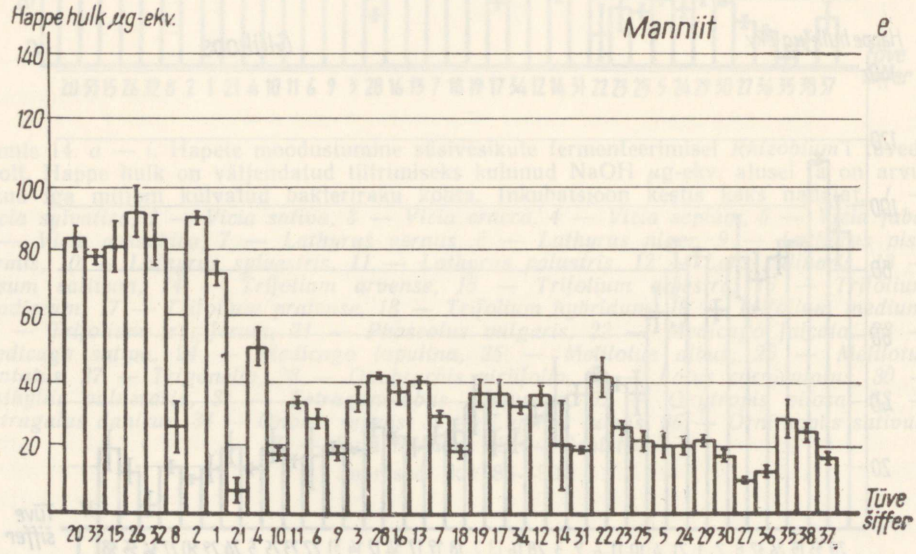
Joonis 14. *a* — *i*. Hapete moodustumine süsivesikute fermenteerimisel *Rhizobium*'i tüvede poolt. Happe hulk on väljendatud tiitrimiseks kulunud NaOH µg-ekv. alusel ja on arvutatud iga miljoni külvatud bakteriraku kohta. Inkubatsioon kestis kaks nädalat. *1 — Vicia sylvatica, 2 — Vicia sativa, 3 — Vicia cracca, 4 — Vicia sepium, 5 — Vicia faba, 6 — Vicia cassubica, 7 — Lathyrus vernus, 8 — Lathyrus niger, 9 — Lathyrus pisiformis, 10 — Lathyrus sylvestris, 11 — Lathyrus palustris, 12 — Lens culinaris, 13 — Pisum sativum, 14 — Trifolium arvense, 15 — Trifolium alpestre, 16 — Trifolium spadiceum, 17 — Trifolium pratense, 18 — Trifolium hybridum, 19 — Trifolium medium, 20 — Trifolium fragiferum, 21 — Phaseolus vulgaris, 22 — Medicago falcata, 23 — Medicago sativa, 24 — Medicago lupulina, 25 — Melilotus albus, 26 — Melilotus dentatus, 27 — Trigonella, 28 — Onobrychis viciifolia, 29 — Lotus corniculatus, 30 — Anthyllis vulneraria, 31 — Tetragonolobus siliquosus, 32 — Oxytropis pilosa, 33 — Astragalus danicus, 34 — Ononis repens, 35 — Lupinus luteus, 36 — Ornithopus sativus, 37 — Soja hispida, 38 — Genista.*

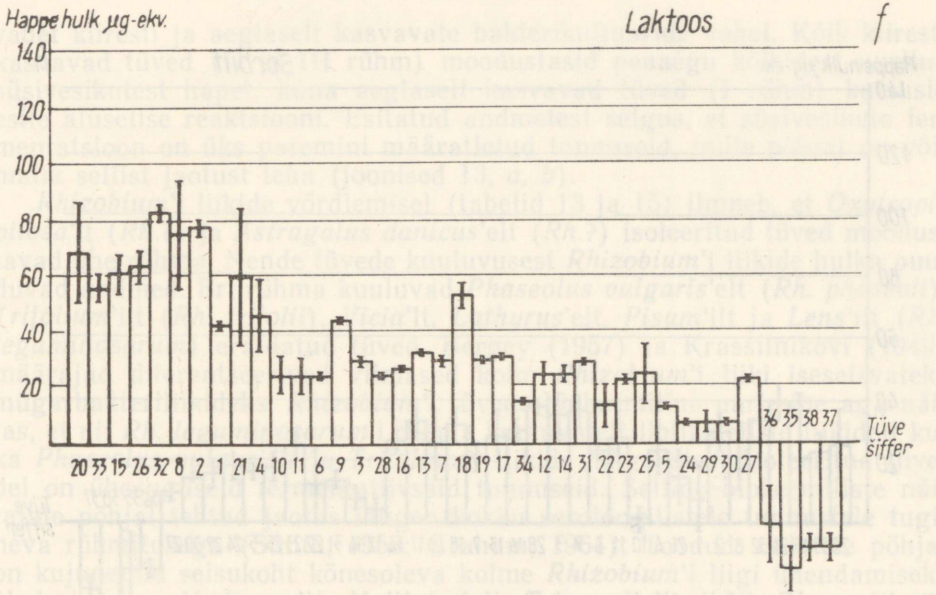
Joonised lk-l 86—90.

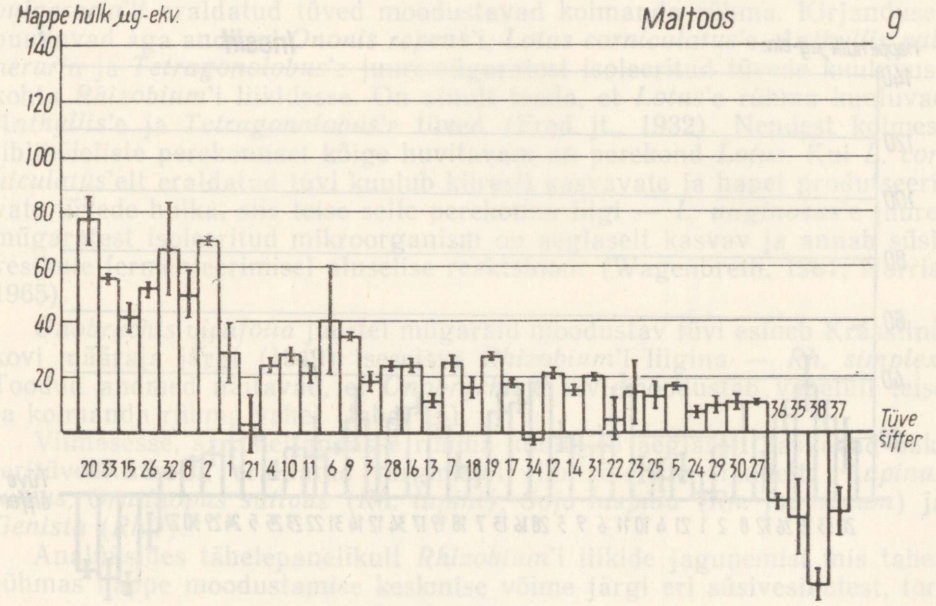

Happe hulk µg-ekv.
Galaktoos
b
160
140
120
100
80
60
40
20
Tüve šiffer
20 33 15 26 32 8 2 1 21 4 10 11 6 9 3 28 16 13 7 18 19 17 34 12 14 31 22 23 25 5 24 29 30 27 36 35 38 37

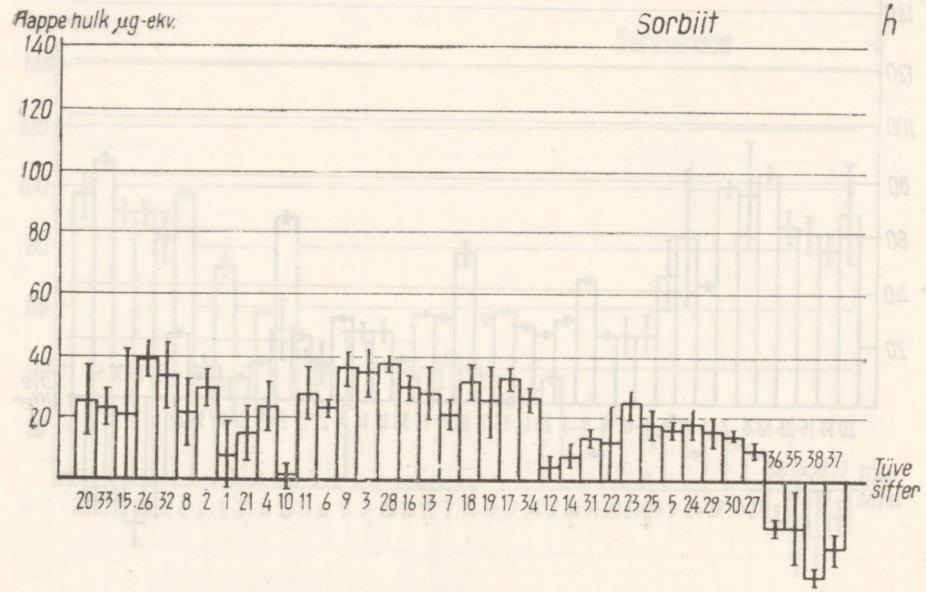

Happe hulk µg-ekv.
Glükoos
c
140
120
100
80
60
40
20
37
Tüve šiffer
20 33 15 26 32 8 2 1 21 4 10 11 6 9 3 28 16 13 7 18 19 17 34 12 14 31 22 23 25 5 24 29 30 27 36 35 38

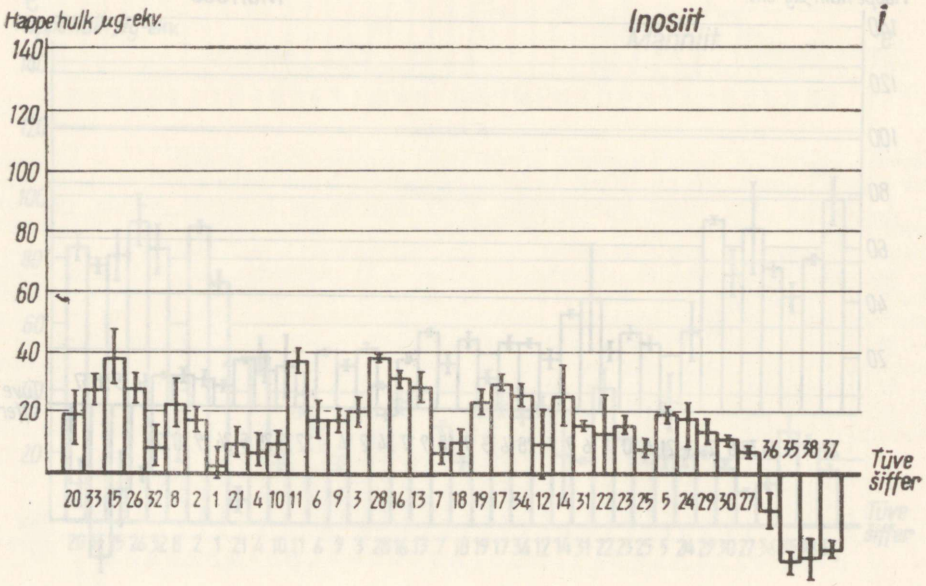

Happe hulk µg-ekv.
Sahharoos
d
140
120
100
80
60
40
20
20 33 15 26 32 8 2 1 21 4 10 11 6 9 3 28 16 13 7 18 19 17 34 12 14 31 22 23 25 5 24 29 30 27 36 35 38 37
Tüve šiffer


Happe hulk µg-ekv.
Manniit
e
140
120
100
80
60
40
20
20 33 15 26 32 8 2 1 21 4 10 11 6 9 3 28 16 13 7 18 19 17 34 12 14 31 22 23 25 5 24 29 30 27 36 35 38 37
Tüve šiffer


Happe hulk µg-ekv.
Laktoos
f
140
120
100
80
60
40
20
20 33 15 26 32 8 2 1 21 4 10 11 6 9 3 28 16 13 7 18 19 17 34 12 14 31 22 23 25 5 24 29 30 27
36 35 38 37
Tüve šiffer


Happe hulk µg-ekv.
Maltoos
g
140
120
100
80
60
40
20
20 33 15 26 32 8 2 1 21 4 10 11 6 9 3 28 16 13 7 18 19 17 34 12 14 31 22 23 25 5 24 29 30 27
36 35 38 37
Tüve šiffer


Happe hulk µg-ekv.
Sorbiit
h
140
120
100
80
60
40
20
20 33 15 26 32 8 2 1 21 4 10 11 6 9 3 28 16 13 7 18 19 17 34 12 14 31 22 23 25 5 24 29 30 27 36 35 38 37
Tüve šiffer


Happe hulk µg-ekv.
Inosiit
i
140
120
100
80
60
40
20
20 33 15 26 32 8 2 1 21 4 10 11 6 9 3 28 16 13 7 18 19 17 34 12 14 31 22 23 25 5 24 29 30 27 36 35 38 37
Tüve šiffer

vahet kiiresti ja aeglaselt kasvavate bakterikultuuride vahel. Kõik kiiresti kasvavad tüved (II ja III rühm) moodustasid peaaegu kõikidest uuritud süsivesikutest hapet, kuna aeglaselt kasvavad tüved (I rühm) kutsusid esile aluselise reaktsiooni. Esitatud andmetest selgus, et süsivesikute fermentatsioon on üks paremini määratletud tunnuseid, mille põhjal on võimalik sellist jaotust teha (joonised 13, *a, b*).

Rhizobium'i liikide võrdlemisel (tabelid 13 ja 15) ilmneb, et *Oxytropis pilosa*'lt (*Rh.*?) ja *Astragalus danicus*'elt (*Rh.*?) isoleeritud tüved moodustavad ühe rühma. Nende tüvede kuuluvusest *Rhizobium*'i liikide hulka puuduvad andmed. Eri rühma kuuluvad *Phaseolus vulgaris*'elt (*Rh. phaseoli*), *Trifolium*'ilt (*Rh. trifolii*), *Vicia*'lt, *Lathyrus*'elt, *Pisum*'ilt ja *Lens*'ilt (*Rh. leguminosarum*) eraldatud tüved. Bergey (1957) ja Krassilnikovi (1949) määrajad diferentseerivad viimased kolm *Rhizobium*'i liiki iseseisvateks mügarbakteriliikideks. *Rhizobium*'i tüvede biokeemiline uurimine aga näitas, et nii *Rh. leguminosarum*'i rühma kuuluvatelt liblikõieliste liikidelt kui ka *Phaseolus vulgaris*'e ja *Trifolium*'i liikide mügaratest isoleeritud tüvedel on ühesuguseid fermentatiivseid tunnuseid. Selline biokeemiliste näitajate põhjal tehtud jaotus langeb kokku seroloogilistele tunnustele tugineva rühmitusega (Smith, 1958; Graham, 1964). Toodud andmete põhjal on kujunenud seisukoht kõnesoleva kolme *Rhizobium*'i liigi ühendamiseks üheks liigiks. *Medicago*'lt, *Melilotus*'elt, *Trigonella*'lt (kõik *Rh. meliloti*), *Ononis repens*'ilt, *Tetragonolobus*'elt, *Lotus corniculatus*'elt ja *Anthyllis vulneraria*'lt eraldatud tüved moodustavad kolmanda rühma. Kirjanduses puuduvad aga andmed *Ononis repens*'i, *Lotus corniculatus*'e, *Anthyllis vulneraria* ja *Tetragonolobus*'e juuremügaratest isoleeritud tüvede kuuluvuse kohta *Rhizobium*'i liikidesse. On ainult teada, et *Lotus*'e rühma kuuluvad *Anthyllis*'e ja *Tetragonolobus*'e tüved (Fred jt., 1932). Nendest kolmest liblikõieliste perekonnast kõige huvitavam on perekond *Lotus*. Kui *L. corniculatus*'elt eraldatud tüvi kuulub kiiresti kasvavate ja hapet produtseerivate tüvede hulka, siis teise selle perekonna liigi — *L. uliginosus*'e juuremügaratest isoleeritud mikroorganism on aeglaselt kasvav ja annab süsivesikute fermenteerimisel aluselise reaktsiooni (Wagenbreth, 1961; Norris, 1965).

Onobrychis viciifolia juurtel mügaraid moodustav tüvi esineb Krassilnikovi määraja järgi (1949) iseseisva *Rhizobium*'i liigina — *Rh. simplex*. Toodud andmed näitavad, et *Onobrychis*'e tüvi moodustab vahelüli teise ja kolmanda rühma vahel (tabel 15).

Viimasesse, s. o. neljandasse rühma kuuluvad aeglaselt kasvavad bakteritüved, mis on eraldatud järgmistelt liblikõieliste liikidelt: *Lupinus luteus, Ornithopus sativus* (*Rh. lupini*), *Soja hispida* (*Rh. japonicum*) ja *Genista* (*Rh.*?).

Analüüsides tähelepanelikult *Rhizobium*'i liikide jagunemist mis tahes rühmas happe moodustamise keskmise võime järgi eri süsivesikutest, tor-

Tabel 15

Statistiliselt olulised erinevused *Rhizobium*'i «liikide» vahel süsivesikute fermentatsioonil moodustunud keskmise hapete hulga järgi (μg-ekv. 10^6 raku kohta)

Rhizobium'i tüvi	Happe hulk	1 72,4	2 66,8	3 45,2	4 40,2	5 38,6	6 31,7	7 26,5	8 22,7	9 21,2	10 15,3	11 14,2	12 —7,0	13 —11,6	14 —12,6
1. *Rh. Astragalus* *	72,4	+	(5,6)	27,2	32,2	33,8	40,7	45,9	49,7	51,2	57,1	58,2	77,4	84,0	85,0
2. *Rh. Oxytropis* *	66,8		+	21,6	26,6	28,2	35,1	40,3	44,1	45,6	51,6	52,6	73,8	88,4	89,4
3. *Rh. phaseoli*	45,2			+	(5,0)	(6,6)	(13,5)	18,7	22,5	24,0	29,9	31,0	52,2	56,8	57,8
4. *Rh. trifolii*	40,2				+	(1,6)	(8,5)	13,7	17,5	19,0	24,9	26,0	47,2	51,8	52,8
5. *Rh. leguminosarum*	38,6					+	(6,9)	12,1	15,9	17,4	23,3	24,4	45,6	50,2	51,2
6. *Rh. simplex*	31,7						+	(5,2)	(9,0)	(10,5)	(16,4)	(17,5)	38,7	43,3	44,3
7. *Rh. meliloti*	26,5							+	(3,8)	(5,3)	(11,2)	(12,3)	33,5	38,1	39,1
8. *Rh. Ononis* *	22,7								+	(1,5)	(7,4)	(8,5)	29,7	34,3	35,3
9. *Rh. Tetragonolobus* *	21,2									+	(5,9)	(7,0)	28,2	32,8	33,8
10. *Rh. Lotus* *	15,3										+	(1,1)	22,3	26,9	27,9
11. *Rh. Anthyllis* *	14,2											+	21,2	25,8	26,8
12. *Rh. lupini*	—7,0												+	(4,6)	(5,6)
13. *Rh. Genista* *	—11,6													+	(1,0)
14. *Rh. japonicum*	—12,6														+

* *Rh.* «liik» peremeestaime järgi.

Seos *Rhizobium*'i tüvede happe moodustamise võime ja peremeestaimede triibuste vahel

Peremeestaime triibus	*Rhizobium*'i rühm happe moodustamise võime järgi			
1. *Galegeae*	I	I		
2. *Vicieae*	II	II	II	II
3. *Trifolieae*	III	III	III	III
Loteae	III	III	III	
Genisteae	IV	IV		
4. *Phaseoleae*	IV	II—(IV)*		
Hedysareae	IV	II		

* *Phaseolus*'elt eraldatud *Rhizobium*'i tüvi kutsub esile enamasti aluselise reaktsiooni ja kuulub seega neljandasse rühma. Käesolevas töös kasutatud tüvi eraldati *Phaseolus vulgaris*'elt, mis on üks väheseid erandeid, kus *Rhizobium* moodustab hapet; seetõttu sattus ta teise rühma.

kab silma tugev seos peremeestaimede triibustega, nimelt kuuluvad ühe ja sama triibuse taimedelt eraldatud *Rhizobium*'i tüved happe moodustamise võime järgi peaaegu eranditult ühte ja samasse rühma, nagu see nähtub tabelist 16.

Nagu tabelist 16 ilmneb, tekitavad tulemused mügarbakterite jaotamisel iseseisvateks liikideks (*Rh. leguminosarum, Rh. trifolii, Rh. meliloti, Rh. phaseoli, Rh. lupini* ja *Rh. japonicum*) kahtlust. Sellest ei tohi aga aru saada nii, et *Rhizobium*'i liigitamisel peaksid põhitunnuseks jääma bakterite fermentatiivsed tunnused. Kuid on ilmne, et *Rhizobium*'i perekonna liikide määramisel ei saa aluseks võtta üksnes nende nakatusvõimet, vaid tuleb arvestada ka kõiki teisi (morfoloogilisi, biokeemilisi, füsioloogilisi, seroloogilisi jne.) omadusi.

Mõnede uurijate (Georgi ja Ettinger, 1941) arvates fermenteeritakse mono- ja disahhariide koos happe moodustamisega märksa kiiremini kui tri- või polüsahhariide. Kuid ükski bakteritüvi ei ole võimeline produtseerima hapet dekstriinist. Dekstriini soovitavad need uurijad testiks *A. radiobacter*'i eraldamisel *Rhizobium*'ist, sest kultuuriomaduste järgi on nende eristamine teineteisest peaaegu võimatu.

Tabelis 17 esitatud andmed näitavad, et monosahhariididest fermenteeriti kõige paremini arabinoosi, galaktoosi ja glükoosi, disahhariididest — sahharoosi ja mitmealuselistest alkoholidest — mannitooli. Laktoos aga moodustas iseseisva rühma. Kõige halvemini fermenteeriti maltoosi ning mitmealuselistest alkoholidest sorbitooli ja inositooli. Erandi moo-

Statistiliselt olulised erinevused süsivesikute vahel nende fermenteerimisel *Rhizobium*'i tüvede poolt moodustunud keskmise hapete hulga järgi (µg-ekv. 10 kohta)

Süsivesik	Happe hulk	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		43,2	42,9	40,9	37,7	36,7	28,6	20,0	17,7	14,7
1. Arabinoos	43,2	+	(0,3)	(2,3)	(5,5)	(6,5)	14,6	23,2	25,5	28,5
2. Galaktoos	42,9		+	(2,0)	(5,2)	(6,2)	14,3	22,9	25,2	28,2
3. Glükoos	40,9			+	(3,2)	(4,2)	12,3	20,9	23,2	26,2
4. Sahharoos	37,7				+	(1,0)	9,1	17,7	20,0	23,0
5. Mannitool	36,7					+	(8,1)	16,7	19,0	22,0
6. Laktoos	28,6						+	(8,6)	10,9	13,9
7. Maltoos	20,0							+	(2,3)	(5,3)
8. Sorbitool	17,7								+	(3,0)
9. Inositool	14,7									+

dustas mannitool, mida fermenteeriti niisama hästi kui monosahhariide ja sahharoosi.

Ka Neal' ja Walkeri (1935) andmeil lõhustavad mügarbakterid galaktoosi ja arabinoosi paremini kui glükoosi, viimast aga paremini kui mannitooli, sahharoosi, laktoosi või maltoosi.

Joshi (1920) järeldas, et manniit on kõige omastatavam süsinikuühend mügarbakteritele. Kuid Reid ja Sarles (1935) leidsid, et sahharoos ületab manniidi ning kõige sobivam süsivesik *Rhizobium*'ile on nende mõlemate, s. o. sahharoosi ja mannitooli kombinatsioon.

Esitatust selgub, et *Rhizobium*'i tüved kasutavad mitmesuguseid süsinikuühendeid, kuid missuguseid ja kuidas, selles küsimuses ei ole veel ühtset seisukohta. Põhjuseks võib olla see, et tihti on uuritud liiga väheseid bakteritüvesid ja et uurimismeetodid on olnud erinevad. Üks tulemusi moonutada võivaid asjaolusid on see, et paljud uurijad on söötmes kasutanud kaltsiumkarbonaati, mis võib tekkinud happeid neutraliseerida, nagu kinnitavad viimaste aastate uurimused (Norris, 1965). Samuti ei saa märkimata jätta, et tavaliselt jäetakse kõrvale nende *Rhizobium*'i tüvede uurimine, mis ei paku agronoomilist huvi.

Tuleb siiski konstateerida, et mügarbakterite klassifitseerimisel on süsivesikute hüdrolüüsimise võime tähtis tunnus ja liigi diagnostikas tuleb tingimata näidata uuritava vormi suhtumist suhkrutesse.

Kokkuvõte

Eesti NSV eri rajoonides kasvavatelt liblikõielistelt isoleeritud *Rhizobium*'i tüved varieeruvad perekonna piirides morfoloogilistelt ja kultuuritunnustelt suhteliselt vähe ning nende üldine sarnasus ei võimalda neid rühmitada üksikute liikide järgi.

Kõik uuritavad bakteritüved on gramnegatiivsed ühtlaselt värvuvad pulgakesed, kusjuures rakkude morfoloogia sõltub arenguastmest. Noored, 24-tunnised bakterirakud on hästi liikuvad homogeense protoplasmaga pulgakesed, vastandina nelja päeva vanustele vakuoliseerunud ja granuleerunud rakkudele, mis liikumisvõime on kaotanud.

Rakkude suuruse järgi jagunevad mügarbakterite tüved kolme rühma: 1) kõige suuremad rakud (läbimõõt 0,7—0,9 μm ja pikkus 2,5—3,5 μm) on *Lathyrus*'elt, *Vicia*'lt, *Trifolium*'ilt, *Medicago*'lt, *Melilotus*'elt ja *Onobrychis*'elt eraldatud kultuuridel; 2) keskmise suurusega rakud (läbimõõt 0,5—0,8 μm ja pikkus 1,5—2,5 μm) on *Phaseolus*'elt, *Ononis*'elt, *Astragalus*'elt, *Oxytropis*'elt, *Ornithopus*'elt, *Lupinus*'elt, *Genista*'lt ja *Soja*'lt isoleeritud kultuuridel; 3) kõige väiksemad rakud (läbimõõt 0,3—0,6 μm ja pikkus 1,0—1,5 μm) on *Lotus*'elt, *Anthyllis*'elt ja *Tetragonolobus*'elt eraldatud kultuuridel.

Kolooniate moodustamise kiiruse järgi kunstlikel söötmetel jagunevad uuritavad bakteritüved kahte põhirühma: kiiresti ja aeglaselt kasvavad. Aeglaselt kasvavateks osutusid *Ornithopus sativus*'e, *Lupinus luteus*'e, *Soja* ja *Genista* juuremügaratest isoleeritud tüved. Ülejäänud 34 tüve kuulusid kiiresti kasvavate hulka. Kolooniate moodustamise kiiruse kohta *Vicia sylvatica*'lt, *V. cassubica*'lt, *Lathyrus vernus*'elt, *L. niger*'ilt, *L. pisiformis*'elt, *Trifolium spadiceum*'ilt, *T. alpestre*'lt, *Melilotus dentatus*'elt, *Tetragonolobus siliquosuse*'lt, *Ononis repens*'ilt, *Oxytropis pilosa*'lt ja *Astragalus danicus*'elt eraldatud tüvede poolt kirjanduses andmed puuduvad ning tuuakse käesolevas töös esmakordselt.

Kolooniate iseloomu erinevused mitmesugustel söötmetel kultiveerimisel ilmnevad kõige selgepiirilisemalt just nende kahe põhirühma (kiiresti ja aeglaselt kasvavad tüved) vahel. Nii moodustavad peaaegu kõik kiiresti kasvavad tüved oa-agaril, MBP-1 ja kongo punasega MBP-1 ümmargused poolläbipaistvad hallikasvalged pealt kumerad limase konsistentsiga kolooniad diameetriga 1—10 mm. Kõik aeglaselt kasvavad tüved annavad väikesed (läbimõõt 0,2—2,0 mm) ümmargused poolläbipaistvad piimjasvalged ja hästi läikiva, opalestseeruva pinnaga kolooniad. Viimased on väga tihke konsistentsiga ja hästi kleepuvad, mistõttu külvinõelaga on neid söötme pinnalt väga raske eemaldada.

Veelgi selgemalt tuleb kiiresti ja aeglaselt kasvavate tüvede vaheline erinevus ilmsiks viburite asetuse võrdlemisel. Elektronmikroskoopilised uurimised näitavad, et kõik aeglaselt kasvavate tüvede rakud on ühe vibu-

riga, mis on kinnitunud raku külge subpolaarselt; neid nimetatakse monotrihhideks, vastandina kiiresti kasvavatele tüvedele, millel viburid on kinnitunud kogu raku pinnale ja mida nimetatakse peritrihhideks.

Teatud lahkuminekud kahe põhirühma vahel ilmnevad ka mügarbakterite kultiveerimisel lakmuspiimas. Kõik aeglaselt kasvavad tüved, mis olid eraldatud *Lupinus luteus*'elt, *Ornithopus sativus*'elt, *Soja hispida*'lt ja *Genista*'lt, annavad lakmuspiimale tugeva aluselise reaktsiooni, kuid ei moodusta «seerum»-tsooni. Kiiresti kasvavate tüvede korral tekib samades tingimustes kas aluseline reaktsioon «seerum»-tsooniga, happeline reaktsioon «seerum»-tsooniga või ainult happeline reaktsioon ilma «seerum»-tsoonita. Sellest selgub, et kiiresti kasvavate tüvede põhirühmas on veel teatud erinevusi, mille põhjal ta omakorda jaguneb kolmeks rühmaks: 1) *Rh. leguminosarum*'i, *Rh. trifolii* ja *Rh. phaseoli* hulka kuuluvad tüved ning *Lotus corniculatus*'elt, *Anthyllis vulneraria*'lt, *Tetragonolobus siliquosus*'elt, *Astragalus danicus*'elt ja *Oxytropis pilosa*'lt eraldatud tüved annavad aluselise reaktsiooni koos «seerum»-tsooniga; 2) *Rh. meliloti* hulka kuuluvad tüved ning *Ononis repens*'ilt isoleeritud tüvi annavad happelise reaktsiooni koos «seerum»-tsooniga; 3) *Onobrychis viciifolia*'lt eraldatud tüvi annab happelise reaktsiooni ilma «seerum»-tsoonita. Huvitav on märkida, et taoline jaotus langeb üldjoontes kokku *Rhizobium*'i tüvede rühmitusega süsivesikute fermentatsiooni järgi, mis omakorda kinnitab seisukohta, et otstarbekam ja õigem on need kolm *Rhizobium*'i liiki *(Rh. leguminosarum, Rh. trifolii, Rh. phaseoli)* ühendada üheks liigiks. On teada, et Smith (1958) ja Graham (1964) on samasugusel seisukohal.

Rhizobium'i tüvede kasvatamisel želatiinis puudusid kindlapiirilised erinevused üksikute tüvede vahel. Nii andsid osa *Rh. leguminosarum*'i hulka kuuluvatest tüvedest, mis olid eraldatud *Vicia sylvatica*'lt, *V. cracca*'lt, *Lathyrus vernus*'elt, *L. niger*'ilt, *L. pisiformis*'elt, *L. sylvestris*'elt ja *Pisum sativum*'ilt, ning *Astragalus danicus*'elt ja *Oxytropis pilosa*'lt eraldatud tüvede külvamisel pisteliselt želatiini kasvu, mis meenutas ladvaga allapoole pööratud kuusekest. Teine osa *Rh. leguminosarumi* tüvedest *(Vicia sativa*'lt, *V. sepium*'ilt, *V. faba*'lt, *V. cassubica*'lt, *Lathyrus palustris*'elt, *Lens culinaris*'elt) ja osa *Rh. trifolii* hulka kuuluvatest tüvedest (*Trifolium arvense*'lt, *T. alpestre*'lt, *T. pratense*'lt, *T. medium*'ilt, *T. fragiferum*'ilt) andsid kogu söötme ulatuses ülalt alla lindikujulise kasvu. Samasuguse kasvu andis ka *Trigonella*'lt isoleeritud tüvi.

Ülejäänud osa *Rh. trifolii* tüvedest andis želatiinis niidikujulise kasvu, mis söötme pindmises osas oli jämedam ja teravnes katseklaasi põhja suunas.

Ka *Onobrychis viciifolia* juuremügaratest eraldatud tüvi andis lindikujulise kasvu. Kuid see oli märksa nõrgem kui *Rh. leguminosarum*'i ja *Rh. trifolii* tüvede kasv želatiinis.

Kõik aeglaselt kasvavad tüved andsid söötmes ülemises osas tugeva

kasvu valge tiheda massi näol, mis katseklaasi põhja suunas nõrgenedes moodustas nõelakujulise teraviku.

Želatiini veeldasid tüved, mis olid eraldatud *Melilotus*'elt, *Medicago*'lt, *Phaseolus vulgaris*'elt, *Ononis repens*'ilt, *Lotus corniculatus*'elt, *Anthyllis vulnerarialt* ja *Tetragonolobus siliquosus*'elt. Viimase kolme tüve korral täheldati pärast neljanädalast inkubatsiooni nõrka želatiini veeldumist ainult söötme ülemises osas. Teiste tüvede puhul oli aga kogu sööde veeldatud.

Esitatud andmetest selgub, et kasvul želatiinis on väga suhteline iseloom, mistõttu mügarbakterite liigi määramisel on ta kõrvalise tähtsusega.

Nii nagu morfoloogiliste ja füsioloogiliste näitajate puhul, jagunevad uuritud *Rhizobium*'i tüved ka biokeemilise tunnuse (süsivesikute fermenteerimise) alusel kaheks teineteisest erinevaks rühmitiseks, mille erinevused moodustavad põhilise osa kõigist tüvedevahelistest lahkuminekutest. Lahkuminekud nende kahe rühmitise vahel on kindlapiirilised ja erinevuste olulisus on statistiliselt tõestatud. Ühe rühmitise moodustavad tüved, mille toimel süsivesikute lagundumisel tekivad happed (kõik kiiresti kasvavad tüved), teise rühma kuuluvad ülejäänud tüved, mis kutsuvad esile aluselise reaktsiooni (aeglaselt kasvavad tüved).

Aeglaselt kasvavate tüvede poolt süsivesikute fermenteerimisel tekkinud aluseline keskkonna reaktsioon süvenes teatava aja (olenevalt süsivesikust), pidurdus siis ja muutus isegi happeliseks (arabinoosi, galaktoosi ja glükoosi fermenteerimisel).

Kirjeldatud erinevust aeglaselt ja kiiresti kasvavate tüvede vahel võib pidada üheks iseloomulikumaks tunnuseks mõlemale rühmale.

Süsivesikute lagundamisel happe moodustumise intensiivsuse järgi jaguneb *Rhizobium*'i kiiresti kasvavate tüvede rühm kaheks alarühmaks: a) mõõdukad (26 tüve — moodustavad kahe nädala jooksul 14—45 µg-ekv. hapet 1 milj. külvatud bakteriraku kohta); b) intensiivsed (8 tüve — moodustavad sama aja jooksul 60—75 µg-ekv hapet 1 milj. külvatud bakteriraku kohta).

Peale selle ilmneb, et *Rhizobium*'i traditsiooniline klassifikatsioon biokeemiliste omaduste järgi ei vasta süsivesikute fermenteerimisel tema tüvede tegelikule rühmitusele. Sama liigi tüvedest võib osa kuuluda mõõdukate, osa aga intensiivsete happemoodustajate rühma. Võrreldes eri *Rhizobium*'i liikide keskmist happe moodustamise võimet, ilmneb, et *Rh. phaseoli*, *Rh. trifolii* ja *Rh. leguminosarum* ei erine üksteisest, vaid moodustavad ühise rühma (keskmine hapete moodustamise võime 40 µg-ekv). Nendest vähem hapet produtseerivad *Rh. meliloti* tüved, mis kuuluvad koos *Ononis*'e, *Tetragonolobus*'e, *Lotus*'e ja *Anthyllis*'e tüvedega teise rühma (keskmine hapete moodustamise võime 20 µg-ekv). Kolmandasse rühma kuuluvad eriti intensiivsed *Astragalus*'e ja *Oxytropis*'e tüved (kesk-

mine hapete moodustamise võime 70 µg-ekv.). *Onobrychis viciifolia*'lt eraldatud tüvi jäi esimese ja teise rühma vahele (keskmine hapete moodustamise võime 32 µg-ekv.).

Happe moodustamise keskmise võime alusel on *Rhizobium*'i liikide rühmituse ja vastavate peremeestaimede triibuse vahel tugev seos. Ühe ja sama triibuse taimedelt eraldatud *Rhizobium*'i tüved kuuluvad happe moodustamise võime järgi peaaegu eranditult ühte ja samasse rühma.

Hapete moodustumise intensiivsuse järgi jagunevad süsivesikud *Rhizobium*'i poolt lagundamisel kolme rühma (intensiivsuse kahanemise järjekorras): 1) arabinoos, galaktoos, glükoos, sahharoos ja mannitool; 2) laktoos; 3) maltoos, sorbitool ja inositool.

Et biokeemiliste näitajate põhjal tehtud jaotus langeb peaaegu kõikidel juhtudel kokku morfoloogilistele ja füsioloogilistele tunnustele tugineva rühmitusega, siis ei tohiks olla kahtlust ka nendevahelise seoste olemasolus.

3. MÜGARBAKTERITE SÜMBIOOS LIBLIKÕIELISTE TAIMEDEGA EESTI NSV-s

Rhizobium'i ja liblikõieliste taimede sümbiootilisi suhteid tunti juba 100 aastat tagasi. Algul arvati, et tegemist on ühe *Rhizobium*'i liigiga *(Bac. radicicola)*, mis on võimeline mügaraid moodustama kõikidel libilikõielistel.

Edasised uurimised liblikõieliste ühe perekonna seemnete nakatamisel teise perekonna mügarbakteritega näitasid, et mügarbakterid, olles kohanenud liblikõieliste teatud perekondade või liikidega, mille juuremügaratest nad eraldati, on vastavatele perekondadele või liikidele spetsiifilised. Nii näiteks mügarbakterid, mis on eraldatud mingi, seejuures ükskõik millise ristiku liigi mügaratest, moodustavad mügaraid ka teistel (seejuures ükskõik millistel) liikidel, kuid ei kutsu esile mügarate tekkimist liblikõieliste teiste perekondade taimedel. Liblikõieliste teiste perekondade (hernes, lutsern, lupiin, seradella) mügarbakterid aga omakorda ei moodusta mügaraid ristikul tema seemnete nakatamisel nendega. Järelikult moodustavad ristiku mügarbakterid spetsiifilisustunnuse järgi omaette rühma.

Mõnede taimede mügarbakterite spetsiifilisus avaldub nõrgemini ja nad võivad moodustada mügaraid mitmel liblikõieliste perekonnal. Nii näiteks bakterid, mis on eraldatud herne, viki, läätse, hiireherne, oa ja seaherne juuremügaratest, võivad vastastikku moodustada mügaraid kõikidel ülalloetud taimede liikidel.

Viimaste aastate uurimistulemused (Wilson, 1946; Greogory, Allen, 1953; Bjälfve, 1963; Dorossinski ja Lazareva, 1966) näitavad, et mügar-

bakteritel puudub kindlapiiriline spetsiifilisus ja et nende jaotamine 6—9 iseseisvaks liigiks ei ole õigustatud. Taksonoomilise jaotuse aluseks on põhiliselt just bakterite spetsiifilisus: võime infitseerida teatud liblikõielist taime ja tekitada tama juurestikus mügaraid. Nii näiteks võivad *Glycine hispida* juuremügaratest eraldatud bakterid (iseseisev liik *Rh. japonicum*) moodustada mügaraid ka lupiinil (Dorossinski ja Lazareva, 1966). Bjälfve (1963) andmetel võivad lupiinilt isoleeritud mügarbakterid nakatada lutserni.

Nii on jõutud ristinokulatsioonirühma mõiste juurde. Ristinokulatsioonirühm kujutab endast teatud hulka peremeestaimi, millest igaüks moodustab mügaraid, kui teda inokuleerida ükskõik milliselt teiselt antud rühma kuuluvalt taimelt isoleeritud bakteritega. Selliste ristinokulatsioonirühmade vahel puudub inokulatsiooni võime või see esineb väga harva. Sellest ajast alates, millal see kontseptsioon tekkis, on teda palju modifitseeritud. Fred, Baldwin, McCoy (1932) esitasid umbes 16 ristinokulatsioonirühma. Hiljem on leitud selles rühmitises palju erandeid. Nüüd on nende rühmade arv taandunud poole tosinani, mille seas suuremad alajaotused arvatakse sõltuvat peremeestaime erinevast vastuvõtlikkusest ja erinevast vastupanuvõimest antud rühmas (Allen, Balwin, 1954).

Spetsiifilisuse küsimuse selgitamisel tuleb eraldi käsitleda bakterite virulentsust ja efektiivsust. Efektiivsuse all mõistetakse mügarbakterite võimet siduda õhulämmastikku ja teha seda kättesaadavaks oma peremeestaimele. Virulentsus on bakterite nakatusvõime: võime tungida taime juurtesse ja moodustada mügaraid. Järelikult võib mügarbakterite efektiivsuse üle otsustada kogutud lämmastiku hulga järgi.

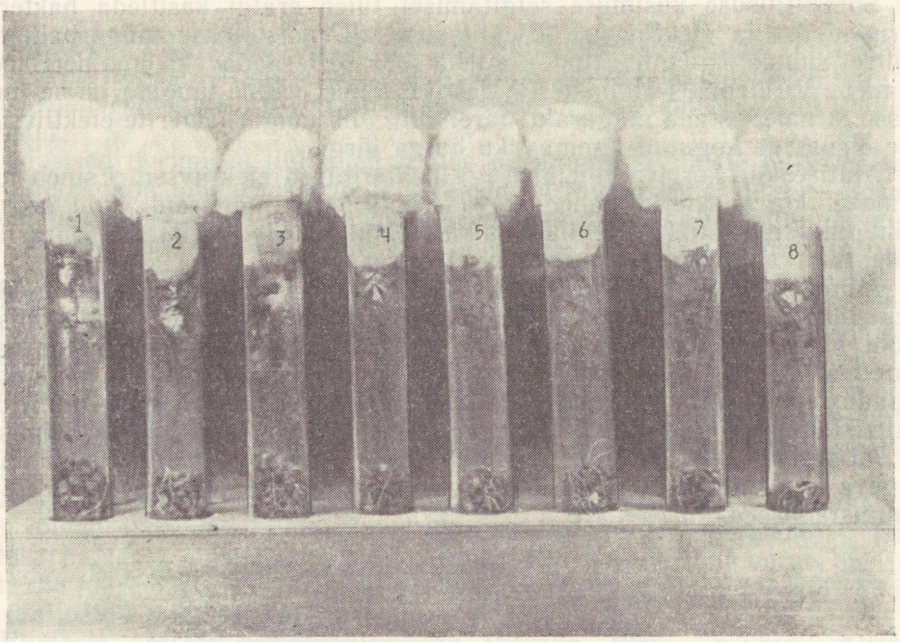
Alati ei ole kõrge virulentsusega bakteritüved efektiivsed. Esineb juhtumeid, kus bakterid moodustavad küll palju mügaraid, kuid seovad vähe õhulämmastikku. Selline sümbioos kujutab üleminekuastet parasitismile, mis kahjustab peremeestaime arengut.

Mügarbakterite spetsiifilisusel, efektiivsusel ja virulentsusel ei ole üksnes suur teoreetiline, vaid ka praktiline tähtsus nitragiini valmistamisel. Kuid nitragiini efektiivsus sõltub paljudest asjaoludest: 1) preparaadi omadustest, 2) bakterite efektiivsusest ja virulentsusest ning 3) mullaomadustest. Kohalike mügarbakterite kultuuride väljaeraldamine nitragiini valmistamiseks on põhilisi tingimusi bakterväetiste efektiivsuse tõstmisel.

Mügarbakterite spetsiifilisuse probleemi uurimine võimaldab leida uusi, tugeva virulentsuse ja kõrge efektiivsusega mügarbakteri tüvesid nitragiini valmistamiseks.

Metoodika

Mügarbakterite tüvede infektsiooniliste omaduste spetsiifilisuse kindlakstegemiseks infitseeriti 11 liblikõieliste-liigi seemneid võõraste liblikõieliste-liikide juuremügaratest isoleeritud *Rhizobium*'i kultuuridega (36 tüve). Enne mügarbakteritega infitseerimist steriliseeriti liblikõieliste seemneid kontsentreeritud H_2SO_4-ga või 0,1%-lise sublimaadilahusega 1,5 minutit. Steriliseeritud seemned idandati. Seemned (3—5 tk. olenevalt liblikõieliste liigist) külvati spetsiaalsetesse (3,5 × 25 cm) katseklaasidesse. Substraadina kasutati kas killustikku (5—10 mm läbimõõduga) või vermikuliiti (3—15 mm läbimõõduga). Killustik hoiti steriliseerimiseks kontsentreeritud H_2SO_4-s, misjärel teda pesti veega kuni neutraalse reaktsioonini ja hoiti siis autoklaavis kolm päeva iga kord 1,5 tundi rõhul 150 kN/m^2. Vermikuliiti saadi Koola poolsaarelt Kovdorski leiukohast. Seda kui inertset (toiteväärtuse seisukohast) ja väga sobivat (aeratsioonirežiimilt) substraati soovitavad taimede kasvatamiseks mitmed autorid (Teijerina,



Joonis 15. *Rhizobium*'i tüvede infitseerimisvõime uurimise katsevariandid.

1956; Raggio jt., 1957; Jemtšev jt., 1963). Vermikuliiti steriliseeriti autoklaavis rõhul 150 kN/m² 3 tundi. Toitelahuseks oli järgmise koostisega segu: 1000 ml destil. vett, 0,136 g KH_2PO_4, 0,492 g $Ca(NO_3)_2$, 0,060 g $MgSO_4$, 0,075 g KCl, 0,025 g Fe_2Cl_6 ja 1 ml mikroelementide segu. Igasse katseklaasi viidi 20 ml nimetatud toitelahust.

Üheaegselt katsevariantidega jäeti kontrolliks katseklaasid idandatud seemnetega, mida ei inokuleeritud *Rhizobium*'i kultuuridega. Kõigi mügarbakterite kultuuride suspensioonide tiiter oli 6×10^6 milj. bakterirakku 1 ml-s. Tiiter määrati nefelomeetrilise meetodi abil. Kordusi igas variandis oli neli. Nagu Manningeri jt. (1960) variatsioonanalüüsid näitavad, jätkub neljast kordusest, et saada usaldusväärseid andmeid taimede kasvatamisel vegetatsiooninõudes. Katseklaase taimedega hoiti laboratooriumis kunstlikus valguses 8—12 nädalat. Katse lõpul fikseeriti taimede juurtel moodustunud mügarate kuju, suurus ning värvus ja loeti nende arv. Pärast seda jaotati materjal kolme ossa: taimede vegetatiivne osa, juured ja mügarad. Eraldatud fraktsioonid kaaluti analüütilistel kaaludel. Taimede vegetatiivne osa ja juured peenestati, paigutati eri toosidesse, asetati kuivatuskappi 100—105°-sesse temperatuuri ning kuivatati konstantse kaaluni. Määramiste tulemused väljendati protsentides kontrolli suhtes. Mügarate arvu ja kaalu kindlaksmääramisel kasutati kontrollina neid liblikõielisi taimi, mis olid nakatatud samalt liigilt isoleeritud tüvedega. Taimede vegetatiivse osa ja juurte kuivainesisalduse määramisel võeti kontrolliks infitseerimata taimed.

Tulemused töötati läbi statistiliselt ja tehti dispersioonanalüüs, kusjuures seosed liblikõieliste taimede vegetatiivse osa ja juurte kuivainesisalduse ning mügarate kaalu ja arvu vahel määrati korrelatsioonarvutuste teel. Seoste tugevust väljendati korrelatsioonikoefitsiendi (r) väärtusena.

Mügarbakterite tiitri nefelomeetriline määramismeetod

Töö vajadustega sobis mügarbakterite tiitri määramiseks kõige paremini nefelomeetriline määramismeetod, mis põhineb bakterite suspensiooni valguse hajutamisvõime mõõtmisel.

Bakterite kontsentratsiooni optilise määramise lahuse hägususe järgi võttis esimesena kasutusele McFarland (1907). Edasised uurimised olid seotud vastavate optiliste mõõteriistade loomise ja täiustamisega, mis valmistati küll keemilisteks analüüsideks, kuid mida kasutati edukalt ka bakterisegude uurimiseks.

Nii kasutasid Muntner (1926) ja Liese (1926) bakterisegude hägususe uurimiseks Kleinmanni nefelomeetrit, Enders ja Kärnbach (1937) Lange fotokolorimeetrit, Toennies ja Gallant (1949) Kolemani spektromeetrit, Williams (1952) fotokolorimeeter-nefelomeetrit jne.

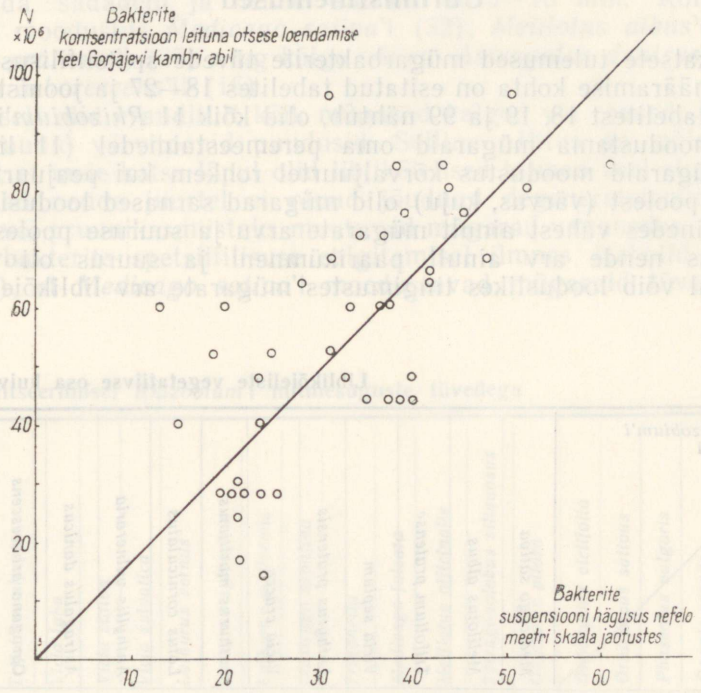
Nõukogude teadlastest on optilise meetodi rakendamist bakteripreparaatide uurimiseks suure põhjalikkusega käsitlenud Fichman (1957—1960).

Mügarbakterite tiitri nefelomeetriline määramine toimus järgmiselt. Mügarbakteri puhaskultuur külvati plaatinaasaga 170 ml MBP söödet sisaldavatesse kolbidesse. Kolbe hoiti 3—8 päeva termostaadis 28° C temperatuuris. Sellisel viisil valmistatud emakultuuridest viidi (eelnevalt kolbe 10 minutit loksutades) steriilse pipetiga 10 ml teise 170 ml steriilse MBP söötmega kolbi. Külve hoiti 3—5, aeglaselt kasvavate tüvede puhul 5—7 päeva termostaadis temperatuuris 28° C. Ettenähtud aja möödumisel võeti kolvid termostaadist välja, loksutati 5 minutit ja viidi 25 ml uuritavat bakterirakkude lahust steriilse pipeti abil 25 mm diameetriga НФМ-tüüpi nefelomeetri küvetti. Küvett uuritava lahusega asetati nefelomeetri kambri tsentrisse ja kamber täideti destilleeritud veega (kuni ettenähtud tasemeni). Lülitati sisse roheline filter K-4 ($\lambda_{ef} = 541$ mm) ja mõlemad mõõtetrumlid viidi jaotusele 100 musta skaala (läbilaskvusprotsent) järgi. Hajutajaks valiti H-4. Vaatevälja poolte heledused tasakaalustati optiliselt parempoolse trumli pööramisega, kui see aga ei õnnestunud ühegi hajutaja puhul, siis viidi parempoolne trummel asendisse 100 (mustal skaalal) ja optiline tasakaal saavutati vasakpoolse trumli pööramisega. Lugem võeti mustalt skaalalt tasakaaluasendis. Kõigil määramistel võeti vähemalt 6 lugemit ja leiti nende keskmine.

Paralleelselt nefelomeetrilise määramisega määrati mügarbakterite tiiter otsese loendamisega Gorjajevi kambri varal. Selleks kanti klaaspulgaga mõni tilk uuritavat bakterisuspensiooni Gorjajevi kambri peale surutud katteklaasi serva juurde, kust vedelik kandus eseme- ja katteklaasi vahelisse ruumi, täites selle ühtlaselt. Rakud loendati kambri mõlema poole ruudustiku 16-s väikeses ruudus. Lugemitest võeti keskmine ja, teades väikese ruudu mahtu (1/4000 mm^3), arvutati bakterite tiiter (bakterite arv 1 ml-s).

Katseseerias nefelomeetrilise meetodi rakendatavuse kontrollimiseks mügarbakterite tiitri määramisel kasutati 42 eri *Rhizobium*'i tüve.

Saadud andmed analüüsiti regressioonarvutuse teel. Algul valiti regressioonvõrrand kujul $N = a + bH$, kus N on bakterite kontsentratsioon loendamise järgi Gorjajevi kambris (cm^{-3}) ja H — bakterisuspensiooni absoluutne hägusus (cm^{-1}) määratuna nefelomeetril. Kontrollides regressioonkonstandi a usaldatavust Studenti testi järgi, selgus, et $t_a = \frac{a}{S_a} < t(f = 41;\ \beta = 0{,}05)$, s. t. osutus mitteoluliseks. Seepärast teostati uus regressioonanalüüs kujul $N = bH$. Arvutuste tulemusena leiti, et regressioonikoefitsient $b = (1{,}84 \pm 0{,}23)\ 10^{10}\ cm^{-2}$ ja bakterite kontsentrat-



Joonis 16. Kalibreerimiskõver bakterite suspensiooni tiitri määramiseks hägususe järgi.

siooni standardhälve regressioonsirge suhtes $S_N = 17 \cdot 10^{10}$ cm^{-2}, moodustades seega täisskaalast 9%. Seega on nelja mõõtmise keskmise näidu standardviga alla 5%, mis on küllaldane ega jää maha täpsusest, mida tavaliselt saavutatakse otsese loendamise korral Gorjajevi kambris.

Regressioonikoefitsiendi põhjal leitud kalibreerimiskõver on toodud joonisel 16.

Gorjajevi kambri varal loendatud bakterirakkude arvu ja nefelomeetrilisel määramismeetodil saadud andmete korrelatsioonarvutused näitasid (korrelatsioonikoefitsient 0,724 ning tõenäosus $> 99{,}9\%$), et kirjeldatud metoodika võimaldab küllaldase täpsusega analüüsida suspensiooni bakterirakkude sisaldust.

Uurimistulemused

Meie katsete tulemused mügarbakterite tüvede spetsiifilisuse ja virulentsuse määramise kohta on esitatud tabelites 18—27 ja joonistel 17—27.

Nagu tabelitest 18, 19 ja 99 nähtub, olid kõik 11 *Rhizobium*'i tüve võimelised moodustama mügaraid oma peremeestaimedel (11 liblikõielise liigil). Mügaraid moodustus kõrvaljuurtel rohkem kui peajuurtel. Teiste omaduste poolest (värvus, kuju) olid mügarad sarnased looduslike mügaratega, erinedes vahest ainult mügarate arvu ja suuruse poolest. Tavaliselt ulatus nende arv ainult paarikümneni ja suurus oli 3—5 mm. Samal ajal võib looduslikes tingimustes mügarate arv liblikõieliste juur-

Liblikõieliste vegetatiivse osa kuivainesisaldus

Rhizobium'i tüvi / Indikaatortaim	*Medicago sativa*	*Melilotus albus*	*Trifolium pratense*	*Vicia sepium*	*Lathyrus pratensis*	*Vicia cracca*	*Lathurus maritimus*	*Lotus corniculatus*	*Anthyllis vulneraria*	*Astragalus danicus*	*Caragana arborescens*	*Lupinus*	*Soja*	*Trifolium fragiferum*
1. *Medicago sativa*	1090	1150	530					500	370	380	390	460		
	236	248	114					109	80	81	84	100		
2. *Melilotus albus*	1030	1010	440	470				620	420	400	550	430		
	207	202	89	94				124	85	81	109	86		
3. *Trifolium pratense*	620	460	890	420				430	480	430	440	430		890
	143	104	204	96				99	109	98	100	99		203
4. *Vicia sepium*	260	270	240	550	510	550	500	510	510	280	300	270		
	91	94	85	195	180	197	177	182	181	101	105	97		
5. *Lathyrus pratensis*	270	280	270	480	500	530	500	480	490	240	540	230		
	101	103	100	180	186	196	187	177	181	89	200	86		
6. *Vicia cracca*	250	270	280	530	510	550	510	440	560	200	260	270		
	88	97	100	191	182	196	182	157	165	69	93	95		
7. *Lathyrus maritimus*	320	360	370	630	570	550	590	560	560	300	270	250		
	106	118	121	210	188	182	194	186	185	100	90	83		
8. *Lotus corniculatus*	310	310	320	650	700	680	690	660	640	340	290	290		
	105	104	110	222	237	232	234	224	217	116	98	99		
9. *Anthyllis vulneraria*	310	300	290	750	730	740		710	740	320	300	320		
	108	104	101	259	252	255		244	255	109	101	111		
10. *Astragalus danicus*	250	240	260	260		260		280	230	580	400	240		
	95	92	96	99		98		105	88	219	151	90		
11. *Caragana arborescens*	250	260	250	270	250	260	250	260	330	250	550	260		
	98	104	97	108	98	103	100	102	130	99	218	104		

Märkus. Igas paarisreas ülal kuivainesisaldus mg-des ja all kuivainesisaldus %-des kontrolli suhtes.

tel ulatuda sadadeni ja nende suurus on 5—10 mm. Kõige rohkem mügaraid moodustus *Medicago sativa*'l (32), *Melilotus albus*'el (24) ja *Trifolium pratense*'l (37) ning kõige vähem *Astragalus danicus*'el (14) ja *Caragana arborescens*'il (16).

Värvuselt olid eranditult kõik mügarad valged või roosad. Pruunid ja mustjaspruunid värvitoonid puudusid. Selline nähtus on mõistetav, kui arvestada, et meie katse lõpul olid libiikõielised taimed veel elujõulised ja et mügarad nende juurtel ei olnud jõudnud degeneratsioonistaadiumi. Pruuniks või pruunikasmustaks muutuvad mügarad vananedes.

Mügarbakterite spetsiifilisuse selgitamisel ilmnes (tabelid 18—22 ja joonis 21), et *Medicago sativa*'l moodustavad mügaraid tüved, mis on

Tabel 18

taimede infitseerimisel *Rhizobium*'i mitmesuguste tüvedega

Trifolium spadiceum	*Trifolium hybridum*	*Trifolium arvense*	*Trifolium alpestre*	*Vicia faba*	*Vicia sativa*	*Vicia sylvatica*	*Lathyrus vernus*	*Lathyrus sylvestris*	*Lathyrus pisiformis*	*Medicago lupulina*	*Trigonella*	*Medicago falcata*	*Melilotus officinalis*	*Tetragonolobus siliquosus*	*Oxytropis pilosa*	*Onobrychis viciifolia*	*Ornithopus sativus*	*Phaseolus vulgaris*	*Ononis repens*	*Genista*	*Pisum sativum*	Kontroll
460				500						910	1250	960	1010	370	350	480	420		560	330	420	460
100				107						196	271	208	219	80	76	104	91		121	72	90	100
	520			510						820	1030	830	840	430	490	420		440	820	510		500
	105			103						165	207	166	168	87	98	83		87	165	103		100
880	900	940	810	440			390							410	420	440			430	420		440
202	205	214	185	101			89							93	97	100			99	95		100
		260		550			530	510	530					510	290	270			280	280		280
		93		196			185	178	184					178	100	95			101	100		100
				510	500		520	540	520					400	260		260				520	270
				189	188		193	200	193					147	97		99				193	100
				500	540	510	580	520		250				320	240						600	280
				176	191	182	206	186		90				112	84						213	100
				540			590							450							560	300
				179			197							149							187	100
	300			620		610	540		660					680	380				380		630	300
	102			211		208	184		224					238	129				130		215	100
				710	610			410		290				470	300				370			290
				245	210			140		101				163	102				127			100
		300		260						370	300	340	330		440				340			260
		104		97						133	113	127	125		164				129			100
		240		300			280			250				310								250
		91		121			110			98				122								100

isoleeritud järgmiste liblikõieliste juuremügaratest: *Medicago sativa* (tüvi 1), *Melilotus albus* (tüvi 2), *Astragalus danicus* (tüvi 10), *Lupinus luteus* (tüvi 12), *Trifolium spadiceum* (tüvi 15), *Vicia faba* (tüvi 19), *Medicago lupulina* (tüvi 25), *Trigonella* (tüvi 26), *Medicago falcata* (tüvi 27), *Melilotus officinalis* (tüvi 28), *Onobrychis viciifolia* (tüvi 31) ja *Ononis repens* (tüvi 34). Kirjanduse andmetel (Fred jt. 1932; Purchase, 1953; Vincent, 1954) moodustavad tüvede 1, 2, 25, 26, 27 ja 28 peremeestaimed iseseisva ristinokulatsioonirühma — *Rhizobium meliloti*. Seetõttu on loomulik, et kõik nendelt taimedelt isoleeritud tüved tekitavad *Medicago sativa*'l mügaraid. Tüved 12, 15, 19 ja 31 kuuluvad aga eri rist-

Liblikõieliste juurte kuivainesisaldus taimede

Indikaator-taim \ *Rhizobium*'i tüvi	*Medicago sativa*	*Melilotus albus*	*Trifolium pratense*	*Vicia sepium*	*Lathyrus pratensis*	*Vicia cracca*	*Lathyrus maritimus*	*Lotus corniculatus*	*Anthyllis vulneraria*	*Astragalus danicus*	*Caragana arborescens*	*Lupinus*	*Soja*	*Trifolium fragiferum*
1. *Medicago sativa*	270	240	120					140	110	150	120	150		
	198	176	88					101	79	110	88	110		
2. *Melilotus albus*	220	230	100	110				140	100	120	150	120		
	209	223	98	108				132	98	113	144	110		
3. *Trifolium pratense*	120	100	160	90				100	120	80	120	100		160
	100	76	126	74				82	92	60	92	80		130
4. *Vicia sepium*	17	19	18	71	70	74	63	43	53	21	22	18		
	88	98	95	371	362	385	326	224	274	107	112	95		
5. *Lathyrus pratensis*	18	14	20	69	62	74	57	59	54	16	46	20		
	86	65	95	334	298	354	272	282	262	79	219	97		
6. *Vicia cracca*	19	19	22	65	66	71	59	37	51	19	20	18		
	92	92	104	312	317	340	286	176	247	91	95	84		
7. *Lathyrus maritimus*	20	18	20	40	41	39	41	48	49	20	19	17		
	97	89	95	194	198	184	197	228	236	95	89	83		
8. *Lotus corniculatus*	20	21	22	43	46	41	39	37	40	24	19	19		
	95	100	104	208	221	197	188	178	190	113	90	92		
9. *Anthyllis vulneraria*	20	21	20	40	37	31		45	44	21	20	21		
	80	84	79	161	147	122		179	176	82	78	83		
10. *Astragalus danicus*	18	17	20	18		17		18	19	32	37	20		
	78	76	86	78		75		80	84	140	163	88		
11. *Caragana arborescens*	19	18	20	19	19	21	17	19	24	18	63	23		
	90	85	97	89	91	100	80	90	115	88	301	108		

Märkus. Igas paarisreas ülal kuivainesisaldus mg-des ja all kuivainesisaldus %-des kontrolli suhtes.

inokulatsioonirühmadesse *(Rh. lupini, Rh. trifolii, Rh. leguminosarum, Rh. simplex)*. Need tüved moodustasid taimede juurtel mügaraid tunduvalt vähem (keskmiselt 6 mügarat) kui sama ristinokulatsioonirühma taimedelt isoleeritud tüved (keskmiselt 26 mügarat). Peab lisama, et tüved 12 ja 31 moodustasid mügaraid ainult kahel korral. Seepärast on tarvis enne lõpliku järelduse tegemist neid tulemusi veel kontrollida. Ülejäänud tüved (10 ja 34), mis olid isoleeritud vastavalt *Astragalus danicus*'e ja *Ononis repens*'i mügaratest, andsid mügaraid ka *Medicago sativa*'l. Kirjanduses puuduvad andmed nende taimede kuuluvuse kohta ristinokulatsioonirühmadesse. Ei ole ka teada, millise *Rhizobium*'i liigi alla võib paigutada

Tabel 19

infitseerimisel *Rhizobium*'i mitmesuguste tüvedega

Trifolium spadiceum	*Trifolium hybridum*	*Trifolium arvense*	*Trifolium alpestre*	*Vicia faba*	*Vicia sativa*	*Vicia sylvatica*	*Lathyrus vernus*	*Lathyrus sylvestris*	*Lathyrus pisiformis*	*Medicago lupulina*	*Trigonella*	*Medicago falcata*	*Melilotus officinalis*	*Tetragonolobus siliquosus*	*Oxytropis pilosa*	*Onobrychis vicifolia*	*Ornithopus sativus*	*Phaseolus vulgaris*	*Ononis repens*	*Genista*	*Pisum sativum*	Kontroll
186				180						230	250	240	230	130	120	180	120		200	130	160	140
133				131						166	178	173	169	94	86	127	90		148	94	112	100
	150			150						180	190	240	240	150	140	110		120	210	150		100
	146			144						170	190	228	228	142	130	106		113	199	142		100
170	160	150	160	110			90							110	120	130			100	100		120
134	130	124	132	86			72							90	92	102			84	78		100
		18		44			52	69	52					51	19	18			20	20		20
		95		228			272	356	269					265	98	92			103	103		100
				71	59		62	62	65					49	18			22			67	21
				341	283		300	300	313					235	85			106			319	100
				60	66	56	56	60		20				41	19						68	21
				288	317	268	270	288		97				196	92						326	100
				39			61							34							50	22
				185			292							164							238	100
	20			41		50	60		59					59	26				37		43	21
	95			197		238	289		282					284	126				179		206	100
		23		49	52			30		19				31	21				22			24
		90		196	208			119		77				122	82				86			100
		20		21						32	20	26	23		30				23			23
		87		91						141	89	114	102		131				99			100
				24			24			20				23								21
				115			114			97				109								100

nende taimede mügaratest isoleeritud mügarbakterid. Meie katsetest selgus, et *Ononis repens*'ilt eraldatud tüvi 34 moodustas küllaltki suurel hulgal mügaraid (16) *Medicago sativa*'l ja teisel sama ristinokulatsioonirühma taimel — *Melilotus albus*'el (9 mügarat). Siit võib teha esialgse järelduse, et *Ononis repens*'ilt eraldatud tüvi 34 kuulub *Rh. meliloti* alla, et liblikõieline ise kuulub *Medicago sativa* ja *Melilotus albus*'ega samasse ristinokulatsioonirühma.

Melilotus albus'el moodustasid mügaraid kõik needsamad tüved, mis *Medicago sativa*'lgi, välja arvatud tüved 12, 15 ja 31. Lisaks nendele andsid mügaraid veel *Lotus corniculatus*'elt (tüvi 8), *Astragalus danicus*'elt (tüvi 10), *Caragana arborescens*'ilt (tüvi 11) ja *Trifolium hybridum*'ilt

Liblikõieliste juuremügarate arv taimede

Rhizobium'i tüvi / Indikaatortaim	*Medicago sativa*	*Melilotus albus*	*Trifolium pratense*	*Vicia sepium*	*Lathyrus pratensis*	*Vicia cracca*	*Lathyrus maritimus*	*Lotus corniculatus*	*Anthyllis vulneraria*	*Astragalus danicus*	*Caragana arborescens*	*Lupinus*	*Soja*	*Trifolium fragiferum*
1. *Medicago sativa*	32	32								3		1		
	100	102								9		4		
2. *Melilotus albus*	25	24						4		5	4			
	107	100						18		22	16			
3. *Trifolium pratense*	16		37											20
	44		100											53
4. *Vicia sepium*				22	17	27	16	13	8		4			
				100	77	127	74	58	36		15			
5. *Lathyrus pratensis*				25	19	22	12	11	12		12			
				138	100	122	66	58	68		63			
6. *Vicia cracca*				20	11	26	15	12	9		2			
				75	41	100	57	43	36		7			
7. *Lathyrus maritimus*				22	24	20	19	16	19	2				
				115	124	102	100	81	96	12				
8. *Lotus corniculatus*				10	13	18	16	19	18					
				52	70	96	82	100	96					
9. *Anthyllis vulneraria*	1	3		18	13	13		24	25					
	4	13		72	52	51		95	100					
10. *Astragalus danicus*								3	1	14	8			
								22	7	100	57			
11. *Caragana arborescens*						5	5	5	7		16			
						29	30	29	33		100			

Märkus. Igas paarisreas ülal mügarate arv ja all mügarate arv %-des kontrolli suhtes.

(tüvi 16) isoleeritud tüved. Saadud tulemused on eriti huvipakkuvad *Lotus corniculatus*'e ja *Caragana arborescens*'i tüvede suhtes. Seni ei ole teadaolevatel kirjanduse andmetel (Gregory jt., 1953) suudetud asetada peremeestaime *Caragana arborescens*'i sümbiootilisi baktereid ühegi praegu kindlaksmääratud inokulatsioonirühma.

Peremeestaimed *Lotus corniculatus, Anthyllis vulneraria* ja *Tetragonolobus siliquosus* moodustavad iseseisva inokulatsioonirühma (Fred jt., 1932). Millise *Rhizobium*'i liigi hulka nende mügarates asuvad bakterid kuuluvad, selle kohta kirjanduses andmed puuduvad. On ainult teada, et *Lotus corniculatus*'e ja *Anthyllis vulneraria* juuremügaratest eraldatud bakterid moodustavad mügaraid *Ornithopus sativus*'e, *Astragalus glycyphyllus*'e ja *Ononis repens*'i juurtel (Jensen, 1964).

Tabel 20

infitseerimisel *Rhizobium*'i mitmesuguste tüvedega

Trifolium spadiceum	*Trifolium hybridum*	*Trifolium arvense*	*Trifolium alpestre*	*Vicia faba*	*Vicia sativa*	*Vicia sylvatica*	*Lathyrus sylvestris*	*Lathyrus pisiformis*	*Medicago lupulina*	*Trigonella*	*Medicago falcata*	*Melilotus officinalis*	*Tetragonolobus siliquosus*	*Oxytropis pilosa*	*Onobrychis viciifolia*	*Ornithopus sativus*	*Phaseolus vulgaris*	*Ononis repens*	*Genista*	*Pisum sativum*
5				7					25	30	24	18			2			16		
16				28					80	94	75	58			8			51		
	4			6					28	37	26	30						13		
	15			25					122	154	110	127						58		
22	25	24	18																	
60	66	64	50																	
				23			23	21	19				11							
				101			101	92	76				48							
				15	18		18	17	20				7							18
				80	97		96	80	107				36							99
				23	25	21	23	16					9	1						19
				88	95	80	86	62					33	2						72
				22			20						5							10
				113			100						26							52
				16			10						13	4				5		12
				85			55						68	23				27		61
				16	12	11		12	9				13	1				3		
				62	48	57		46	47				52	5				12		
										6	1	2	3	10				4		
										46	6	16	20	71				29		
				2			6						2							
				15			36						11							

Trifolium pratense'l täheldati mügarate ilmumist kõikide ristikute liikidelt eraldatud mügarbakteri tüvedega nakatamisel. Kõige rohkem mügaraid (37) moodustas tüvi 3, mis isoleeriti sama liigi *(Trifolium pratense)* mügaratest, teised tüved — 14 (*Trifolium fragiferum*'ilt), 15 (*Trifolium spadiceum*'ilt), 16 (*Trifolium hybridum*'ilt), 17 (*Trifolium arvense*'lt) ja 18 (*Trifolium alpestre*'lt) — moodustasid vastavalt 20, 22, 25, 24, 18 mügarat. *Trifolium pratense*'l moodustas mügaraid (16) ka *Medicago sativa* juuremügaratest eraldatud tüvi. Ehkki need mügarad olid väga väikesed, on see fakt huvitav sellepärast, et kuni käesoleva ajani peeti ristikute rühma kõige selgemini väljakujunenud spetsiifilisusega mügarbakterite rühmaks (Bialosuknia jt., 1923; Baird, 1955).

Liblikõieliste juuremügarate kaal taimede

Indikaatortaim \ *Rhizobium*'i tüvi	*Medicago sativa*	*Melilotus albus*	*Trifolium pratense*	*Vicia sepium*	*Lathyrus pratensis*	*Vicia cracca*	*Lathyrus maritimus*	*Lotus corniculatus*	*Anthyllis vulneraria*	*Astragalus danicus*	*Caragana arborescens*	*Lupinus*	*Soja*	*Trifolium fragiferum*
1. *Medicago sativa*	43	46								4		52		
	100	106								9		58		
2. *Melilotus albus*	39	49						10		8	8			
	81	100						20		17	15			
3. *Trifolium pratense*	16		50											37
	55		100											74
4. *Vicia sepium*				67	68	87	65	51	32		10			
				100	101	128	97	76	48		14			
5. *Lathyrus pratensis*				63	59	53	43	44	30		42			
				106	100	89	73	74	50		72			
6. *Vicia cracca*				70	56	80	45	38	38		5			
				87	69	100	55	47	47		6			
7. *Lathyrus maritimus*				62	65	53	59	43	49					
				106	113	91	100	79	85					
8. *Lotus corniculatus*				18	31	32	27	28	28	4				
				62	110	113	97	100	99	14				
9. *Anthyllis vulneraria*	2	6		30	25	25		34	36					
	6	17		83	68	69		95	100					
10. *Astragalus danicus*								6	3	28	20			
								20	10	100	71			
11. *Caragana arborescens*						10	10	11	15		33			
						30	31	34	45		100			

Märkus. Igas paarisreas ülal mügarate kaal mg-des ja all mügarate kaal %-des kontrolli suhtes.

Et liblikõielised *Vicia sepium, Lathyrus pratensis, Vicia cracca* ja *Lathyrus maritimus* moodustavad iseseisva ristinokulatsioonirühma, siis on loomulik, et tüved 4, 5, 6 ja 7 (isoleeritud samadelt liikidelt) moodustasid mügaraid kõikidel eespool loetletud liblikõielistel. *Vicia sepium*'il moodustas kõige rohkem mügaraid (27) *Vicia cracca*'lt isoleeritud tüvi 6, *Lathyrus pratensis*'el aga (25 mügarat) *Vicia sepium*'ilt eraldatud tüvi 4. Kõige suurem mügarate arv (26) oli *Vicia cracca* nakatamisel samalt liigilt isoleeritud tüvega 6. *Lathyrus maritimus*'el andis kõige rohkem mügaraid (24) tüvi 5, mis oli eraldatud *Lathyrus pratensis*'elt. Veel moodustasid mügaraid nendel neljal liblikõielisel järgmiste liblikõieliste liikide mügaratest isoleeritud tüved: *Lotus corniculatus* (tüvi 8), *Anthyllis vul-*

Tabel 21

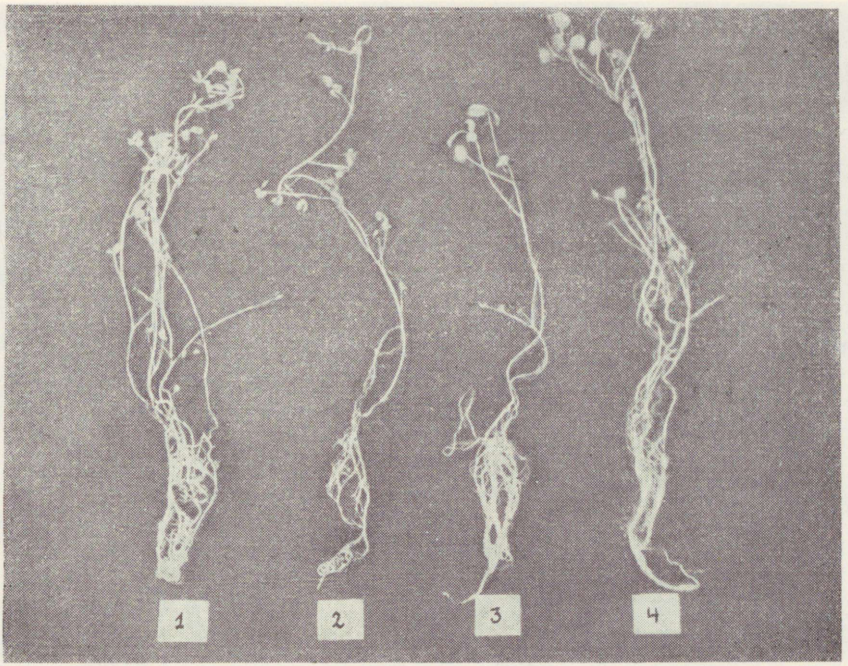
infitseerimisel *Rhizobium*'i mitmesuguste tüvedega

Trifolium spadiceum	*Trifolium hybridum*	*Trifolium arvense*	*Trifolium alpestre*	*Vicia faba*	*Vicia sativa*	*Vicia sylvatica*	*Lathyrus vernus*	*Lathyrus sylvestris*	*Lathyrus pisiformis*	*Medicago lupulina*	*Trigonella*	*Medicago falcata*	*Melilotus officinalis*	*Tetragonolobus siliquosus*	*Oxytropis pilosa*	*Onobrychis viciifolia*	*Ornithopus sativus*	*Phaseolus vulgaris*	*Ononis repens*	*Genista*	*Pisum sativum*
13				17						39	49	38	36			5			20		
30				39						90	113	87	84			3			47		
	7	38	35	14						44	36	37	56						30		
	14	77	70	28						90	74	75	114						62		
40	38																				
81	76																				
				68			61	69	63					35							
				101			90	102	93					52							
				68	50		63	61	65					30							60
				115	84		105	102	109					50							101
				70	61	59	64	51						16	1						52
				86	78	73	79	64						19	1						65
				66			56							8							24
				114			95							13							42
				29		19	20		20					22	9				14		21
				101		67	69		71					77	30				50		73
				32	25			18						23	2				11		
				89	69			51						64	6				15		
										14	2	5	4		20				9		
										50	5	18	13		73				25		
				5			14							2							
				16			43							7							

Tabel 22

Rhizobium'i tüvede infitseerimisvõime

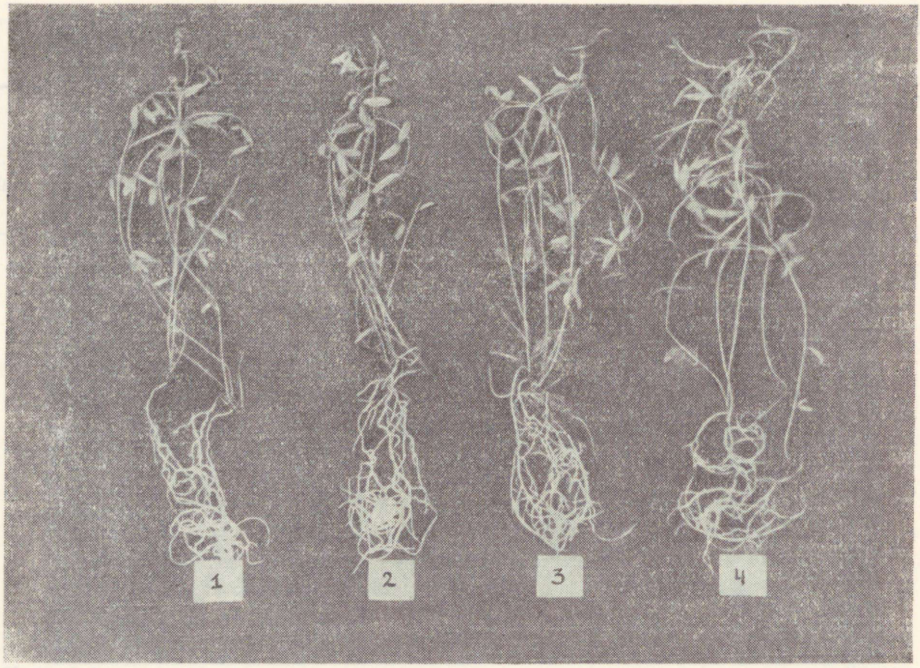
Rhizobium'i tüvi / Liblikõieliste taimede arv	Mügarateta	Mügaratega		Kokku
		mitteefektiivne sümbioos	efektiivne sümbioos	
1. *Medicago sativa*	7	2	2	11
2. *Melilotus albus*	8	1	2	11
3. *Trifolium pratense*	10	—	1	11
4. *Vicia sepium*	5	—	6	11
5. *Lathyrus pratensis*	5	—	6	11
6. *Vicia cracca*	4	1	6	11
7. *Lathyrus maritimus*	4	1	5	10
8. *Lotus corniculatus*	2	3	6	11
9. *Anthyllis vulneraria*	3	2	6	11
10. *Astragalus danicus*	7	3	1	11
11. *Caragana arborescens*	5	3	3	11
12. *Lupinus*	10	1	—	11
13. *Soja*	11	—	—	11
14. *Trifolium fragiferum*	6	—	1	7
15. *Trifolium spadiceum*	—	1	1	2
16. *Trifolium hybridum*	4	1	1	6
17. *Trifolium arvense*	8	—	1	9
18. *Trifolium alpestre*	4	—	1	5
19. *Vicia faba*	2	3	6	11
20. *Vicia sativa*	2	—	3	5
21. *Vicia sylvatica*	2	—	2	4
22. *Lathyrus vernus*	3	1	5	9
23. *Lathyrus sylvestris*	—	1	3	4
24. *Lathyrus pisiformis*	2	—	3	5
25. *Medicago lupulina*	7	1	2	10
26. *Trigonella*	3	1	2	6
27. *Medicago falcata*	—	1	2	3
28. *Melilotus officinalis*	6	1	2	9
29. *Tetragonolobus siliquosus*	4	4	3	11
30. *Oxytropis pilosa*	7	3	1	11
31. *Onobrychis viciifolia*	7	1	—	8
32. *Ornithopus sativus*	6	—	—	6
33. *Phaseolus vulgaris*	7	—	—	7
34. *Ononis repens*	4	4	1	9
35. *Genista*	8	—	—	8
36. *Pisum sativum*	2	—	4	6
Kokku	175	40	88	303



Joonis 17. *Melilotus albus*'e juurtel moodustunud mügarad. Nakatatud *1* — *Trifolium hybridium*'i, *2* — *Ononis repens*'i, *3* — *Medicago lupulina, 4* — *Medicago sativa* juuremügaratest eraldatud tüvedega.

neraria (tüvi 9), *Caragana arborescens* (tüvi 11), *Vicia faba* (tüvi 19), *Vicia sativa* (tüvi 20), *Vicia sylvatica* (tüvi 21), *Lathyrus vernus* (tüvi 22), *Lathyrus sylvestris* (tüvi 23), *Lathyrus pisiformis* (tüvi 24), *Tetragonolobus siliquosus* (tüvi 29), *Oxytropis pilosa* (tüvi 30) ja *Pisum sativum* (tüvi 36). Nendest kõige vähem mügaraid moodustasid *Vicia sepium*'il tüved 9 (8 mügarat), 11 (4 mügarat) ja 29 (11 mügarat), *Lathyrus pratensis*'el tüvi 29 (7 mügarat), *Vicia cracca*'l tüved 9 (9 mügarat), 11 (2 mügarat), 29 (9 mügarat) ja 30 (1 mügar) ning *Lathyrus maritimus*'el tüvi 29 (5 mügarat). Tüvede 11 (*Caragana arborescens*) ja 30 (*Oxytropis pilosa*) poolt moodustatud mügaraid taimede juurtel tuleb vaadelda kui juhuslikku või ebakorrapärast nähtust, sest mügaraid tekkis ainult $^1/_4$—$^1/_2$ juhtudel.

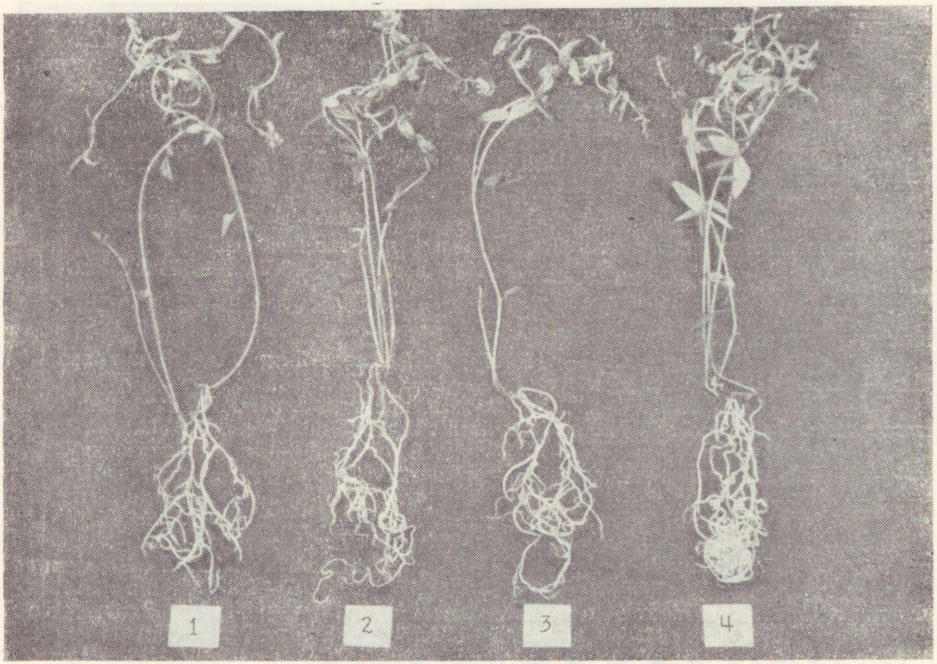
Lotus corniculatus'el moodustasid mügaraid tüved 4 *(Vicia sepium),*



Joonis 18. *Lathyrus pratensis*'e juurtel moodustunud mügarad. Nakatatud *1* — *Lathyrus palustris*'e, *2* — *Astragalus danicus*'e, *3* — *Vicia sepium*'i, *4* — *Caragana arborescens*'i juuremügaratest eraldatud tüvedega.

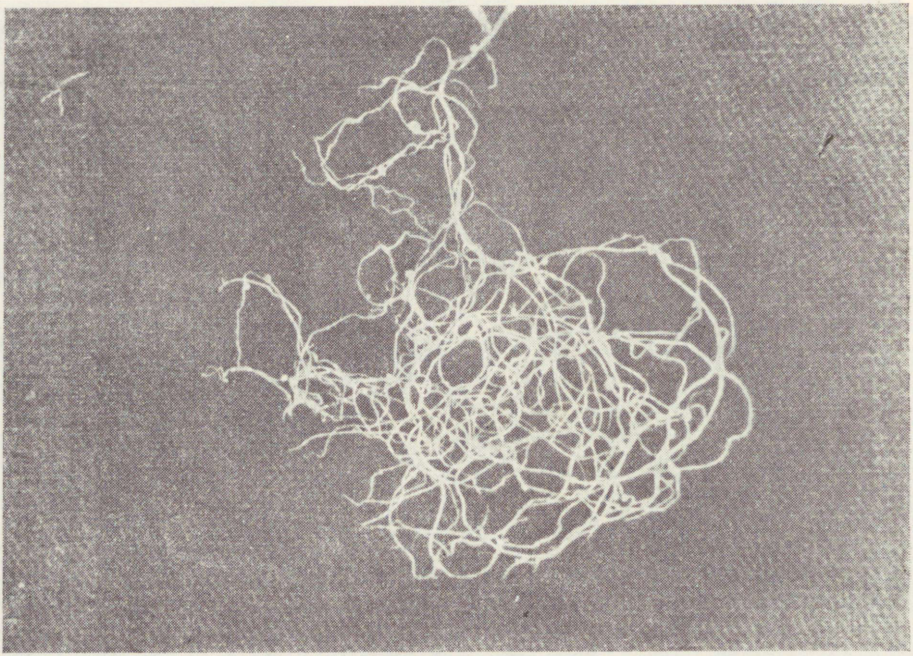
5 (*Lathyrus pratensis*), 6 (*Vicia cracca*), 7 (*Lathyrus maritimus*), 8 (*Lotus corniculatus*), 9 (*Anthyllis vulneraria*), 10 (*Astragalus danicus*), 19 (*Vicia faba*), 21 (*Vicia sylvatica*), 22 (*Lathyrus vernus*), 24 (*Lathyrus pisiformis*), 29 (*Tetragonolobus siliquosus*), 30 (*Oxytropis pilosa*), 34 (*Ononis repens*) ja 36 (*Pisum sativum*). Kõige rohkem mügaraid moodustasid tüved 8, 6 ja 9, mügarate arv vastavalt 19, 18 ja 18, ning kõige vähem tüved 10, 30 ja 34, mügaraid vastavalt 2, 4 ja 5.

Anthyllis vulneraria'l moodustasid mügaraid kõik needsamad tüved, mis *Lotus corniculatus*'elgi, välja arvatud tüvi 10 (*Caragana arborescens*). Ka *Lotus corniculatus*'el moodustas see mügaraid ainult 25% katses olnud taimedest. Võib arvata, et tüve 10 poolt moodustatud mügarad on väga juhuslikku laadi. Lisaks eespool mainitud tüvedele moodustasid *Anthyllis vulneraria*'l mügaraid ka *Medicago sativa* (tüvi 1) ja *Melilotus albus*'e



Joonis 19. *Vicia sepium*'i juurtel moodustunud mügarad. Nakatatud *1* — *Tetragonolobus siliquosus*'e, *2* — *Lathyrus pisiformis*'e, *3* — *Vicia faba, 4* — *Pisum arvense* juuremügaratest eraldatud tüvedega.

(tüvi 2) juuremügaratest isoleeritud tüved. Ka nende tüvede puhul moodustus mügaraid väga vähe ja enamikul katses olnud taimedel need puudusid üldse. *Astragalus danicus*'el andsid mügaraid järgmiste liblikõieliste juuremügaratest isoleeritud tüved: *Lotus corniculatus* (tüvi 8), *Anthyllis vulneraria* (tüvi 9), *Astragalus danicus* (tüvi 10), *Caragana arborescens* (tüvi 11), *Medicago lupulina* (tüvi 25), *Trigonella* (tüvi 26), *Medicago falcata* (tüvi 27), *Melilotus officinalis* (tüvi 28), *Oxytropis pilosa* (tüvi 30) ja *Ononis repens* (tüvi 34). Meie tulemusi kinnitavad ka Aughtry (1948) ja Jenseni (1964) andmed, mille järgi *Astragalus*'e liikidelt isoleeritud tüvede mõjul moodustusid mügarad *Medicago falcata*'l, *Medicago sativa*'l, *Lotus corniculatus*'el ja *Anthyllis vulneraria*'l. Kuid see on vastuolus Bushnelli ja Sarlesi (1937) andmetega, mille järgi *Astragalus*'elt eraldatud bakterid ei mügardanud ühtki nende katsetes olnud liblikõielist



Joonis 20. *Vicia sepium*'i juurtel moodustunud mügarad. Nakatatud *Lathyrus maritimus*'elt juuremügaratest eraldatud tüvedega.

taime *(Medicago sativa, Trifolium pratense, Pisum sativum, Vicia sativa, Vicia faba, Phaseolus vulgaris, Lathyrus odoratus, Soja hispida, Lupinus perennis* jne.) ning, vastupidi, teiste liblikõieliste taimede mügarbakterid ei mügardanud ka *Astragalus*'t. Bushnell ja Sarles jõudsid järeldusele, et *Astragalus* moodustab iseseisva ristinokulatsioonirühma.

Caragana arborescens'il andsid mügaraid tüvi 6 *Vicia cracca*'lt, tüvi 7 *Lathyrus maritimus*'elt, tüvi 8 *Lotus corniculatus*'elt, tüvi 9 *Anthyllis vulneraria*'lt, tüvi 11 *Caragana arborescens*'ilt, tüvi 19 *Vicia faba*'lt, tüvi 22 *Lathyrus vernus*'elt ja tüvi 29 *Tetragonolobus siliquosus*'elt.

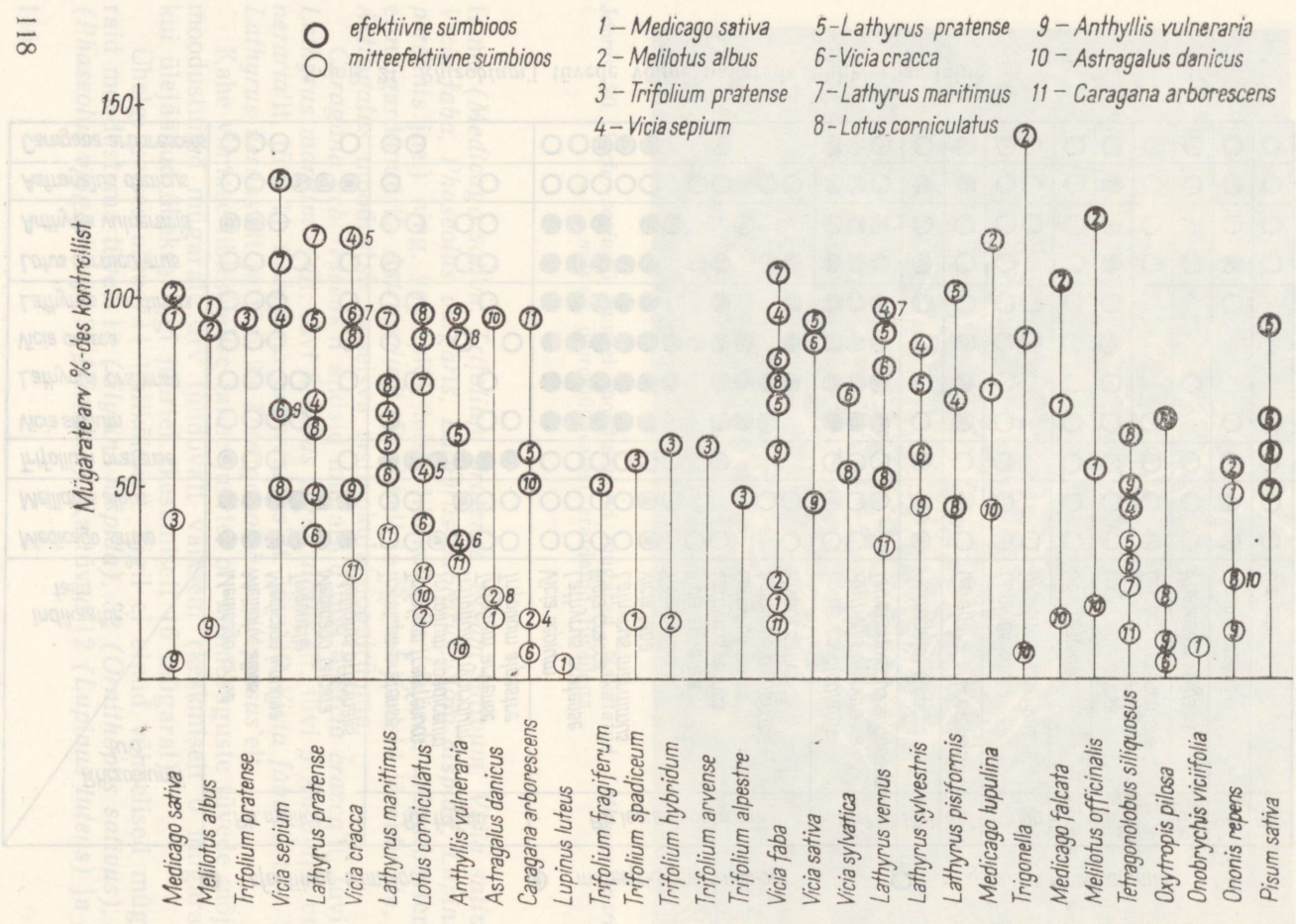
Kahe viimase liblikõielise taime juurtel oli mitmesuguste tüvede mõjul moodustunud mügarate arv tunduvalt väiksem (keskmiselt 6 mügarat) kui ülejäänud üheksa liigi juurtel (keskmiselt 16 mügarat).

Ühelgi katses olnud 11 liblikõieliste liigil ei olnud võimelised mügaraid moodustama tüved 13 *(Glycine hispida)*, 32 *(Ornithopus sativus)*, 33 *(Phaseolus vulgaris)* ja 35 *(Genista)*. Ka tüved 12 *(Lupinus luteus)* ja 31

● efektiivne sümbioos ◉ mitteefektiivne sümbioos ○ mügaraid ei moodustunud

Rhizobium'i tüvi / Indikaatortaim	Rh. meliloti						Rh. trifolii						Rh. leguminosarum										Rh?	Rh?	Rh. lup	Rh. jap.	Rh?	Rh. simp.	Rh. phas	Rh?	Rh?
	Medicago sativa	*Melilotus albus*	*Medicago lupulina*	*Trigonella*	*Medicago falcata*	*Melilotus officinalis*	*Trifolium pratense*	*Trifolium fragiferum*	*Trifolium spadiceum*	*Trifolium hybridum*	*Trifolium arvense*	*Trifolium alpestre*	*Vicia sepium*	*Lathyrus pratense*	*Vicia cracca*	*Lathyrus maritimus*	*Vicia faba*	*Vicia sativa*	*Vicia sylvatica*	*Lathyrus vernus*	*Lathyrus sylvestris*	*Lathyrus pisiformis*	*Pisum sativa*	*Lotus corniculatus*	*Anthyllis vulneraria*	*Tetragonolobus siliquosus*	*Astragalus danicus*	*Caragana arbresens*	*Lupinus luteus*	*Ornithopus sativus*	*Soja hispida*	*Oxytropis pilosa*	*Onobrychis viciifolia*	*Phaseolus vulgaris*	*Ononis repens*	*Genista*
Medicago sativa	●	●	●	●	●	●	○	○	◉	○	○	○	○	○	○	○	◉		○	○			○	○	○	◉	○	◉	○	○	○	●	○	◉	○
Melilotus albus	●	●	●	●	●	●	○	○		◉	○	○	○	○	○	○	◉	○				○	○	◉	○	○	●	◉	●	○	○	○	○	●	○	○
Trifolium pratense	◉	○	○			○	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○		○				○	○	○	○	○	○		○	○	○	○	○	○
Vicia sepium	○	○	○	○			○				○	○	●	●	●	●	●			●	●	●		●	●	●	○	◉	○		○	○	○		○	○
Lathyrus pratense	○	○	○	○		○	○	○			○		●	●	●	●	●			●	●	●	●	●	●	◉	○	●	○		○	○		○		
Vicia cracca	○	○	○			○	○		○		○	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	◉	○	◉	○	○	○	●				
Lathyrus maritimus	○	○	○			○	○	○			○		●	●	●	●				●			●	●	●	◉	○	○	○	○	○	○		○		
Lotus corniculatus	○	○		○		○	○				○	○	●	●	●	●	●		●	●		●	●	●	●	●	◉	○	○		○	●	○	●	○	○
Anthyllis vulneraria	◉	◉	○				○	○			○	○	●	◉	●		●	●			◉			●	●	●	○	○	○	○	○	●	○		●	○	○
Astragalus danicus	○	○	◉	◉	◉	◉	○				○		○	○	○	○	○		○	○		○	○	◉	◉	○	●	●	○	○	○	●	○	○	●	○	○
Caragana arborescens	○	○	○			○	○	○					○	○	◉	◉	◉		◉			○		◉	◉	◉	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Joonis 21. *Rhizobium*'i tüvede võime nakatada liblikõielisi taimi.



Joonis 22. Mügarate arv *Rhizobium*'i eri tüvedega nakatatud liblikõieliste juurtel.

(Onobrychis viciifolia) moodustasid mügaraid ainult 50% *Medicago sativa* taimedel ning needki olid mitteefektiivsed (tabel 20).

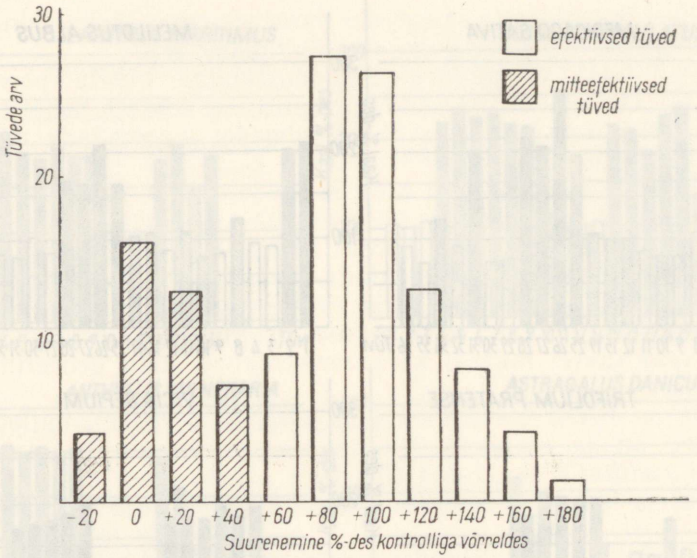
Glycine hispida ja *Lupinus luteus*'e seemnete kasvatamisel katseklaasis hävisid taimed juba 3.—4. nädalal pärast katse algust. On teada, et suureseemneliste liblikõieliste kasvatamine katseklaasis või kolvis on väga raske (suusõnaliselt Jemtšev). Järelikult need taimed, millelt isoleeritud tüved ei mügardanud ühtki võõra liigi liblikõielist, moodustavad iseseisvad ristinokulatsioonirühmad. Kirjanduse andmetel (Dorossinski ja Lazareva, 1966) on teada, et *Rh. japonicum*'i alla kuuluvad tüved on võimelised moodustama mügaraid lupiinil, kuid *Rh. lupini* tüved ei tekita mügaraid *Soja*'l.

Inokulatsioonikatsed, mis korraldati selleks, et kinnitada mügarbakterite tüvede spetsiifilisust ja mügarate moodustamise võimet, näitasid selgesti tüvede omadust tekitada mügaraid identselt nende bakteritega, mis moodustasid mügaraid looduslikes tingimustes kasvavatel peremeestaimedel.

Et spetsiifilisusel, vähemalt katsetingimustes, on otsene efektiivsuse funktsioon, siis määrati sellest aspektist lähtudes taimede kuivainesisaldus. Efektiivseteks loeti need tüved, mille puhul kuivainesisalduse juurdekasv suurenes vähemalt 50%, võrreldes kontrolliga (taimed, mida ei nakatatud bakteritüvedega). Vastavad andmed on toodud tabelites 18 ja 19 ning joonistel 21 ja 24.

Tabelist 18, kus peale mügaraid moodustanud taimede vegetatiivse osa kaaluandmete on võrdluseks sisse võetud ka mõningate mügaraid mittemoodustanud taimede saagiandmed, nähtub, et suurimad kuivaine kogused ühe liblikõielise liigi kohta saadi ühte ristinokulatsioonirühma kuuluvatel taimedelt. Suurim kuivainesisaldus — 125 g (271% kontrolliga võrreldes) — registreeriti seejuures *Medicago sativa*'l, mis oli infitseeritud *Trigonella* juuremügaratest isoleeritud tüvega 26. Palju väiksem ei olnud kuivainesisaldus ka *Anthyllis vulneraria*'l, mis oli infitseeritud tüvedega 4 *(Vicia sepium)*, 5 *(Lathyrus pratensis)*, 6 *(Vicia cracca)*, 9 *(Anthyllis vulneraria)* ning *Lotus corniculatus*'el, mis oli infitseeritud samade tüvedega ja tüvega 29 *(Tetragonolobus siliquosus)*. Kõikidel mügaraid mittemoodustanud taimedel oli kuivainesisaldus madalam ja seda isegi kontrolliga võrreldes, s. o. alla 100%, välja arvatud üksikud erandid. Neist andmetest ilmneb, et taimed, mis kasvasid täiesti steriilsetes tingimustes (kontrolltaimedel puudus igasugune mikrofloora), arenesid neist taimedest paremini, mida küll infitseeriti mügarbakterite tüvedega, kuid millel mügaraid ei moodustunud. Siit võib teha esialgse järelduse, et bakterid, mis ei ole võimelised mügardama liblikõielist taime, ei soodusta taime kasvu, vaid, vastupidi, avaldavad tema arengule kahjulikku mõju. Selle põhjuse väljaselgitamisele ei ole aga käesolevas töös tähelepanu pööratud.

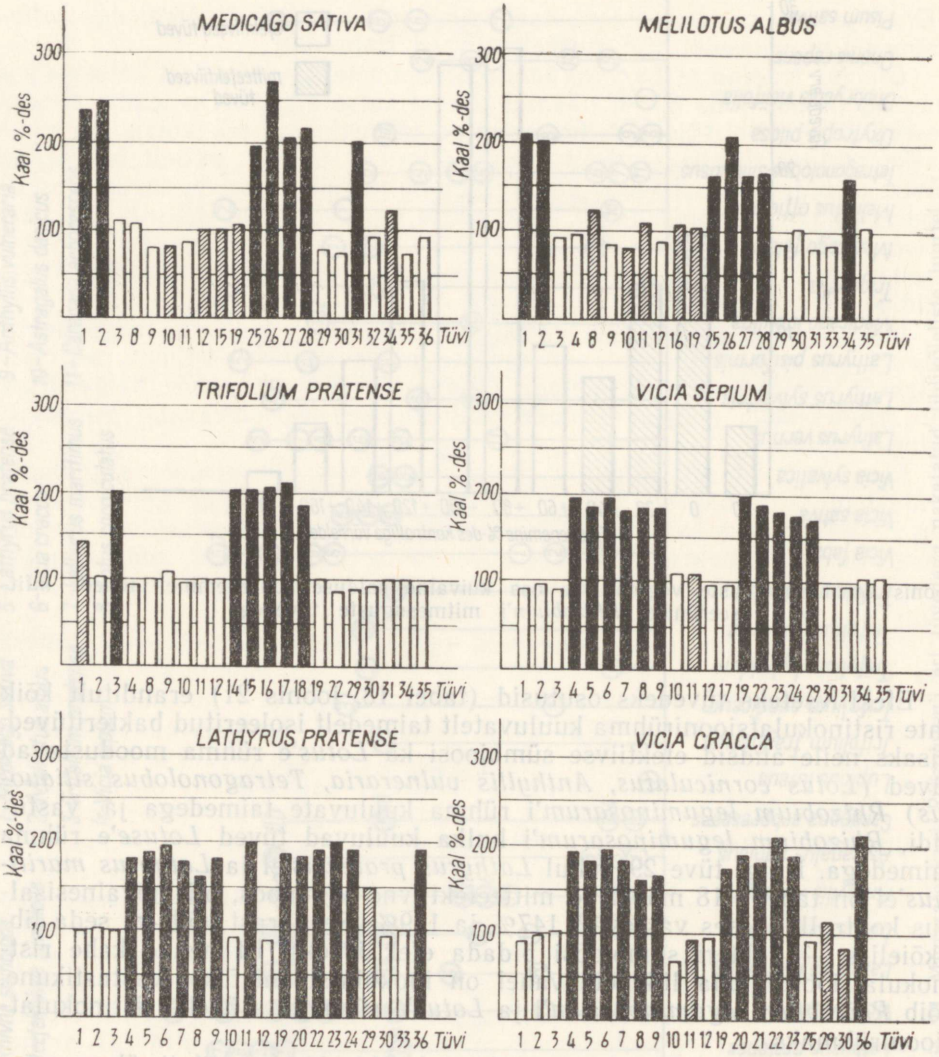
Joonis 23. Mügarate kaal *Rhizobium*'i eri tüvedega nakatatud liblikõieliste juurtel.



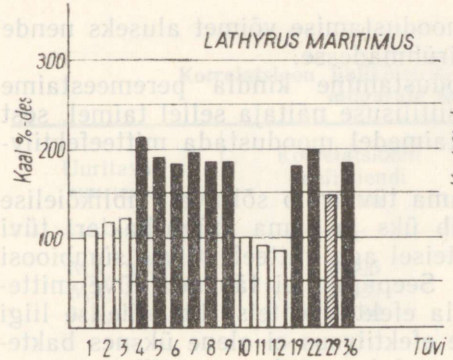
Joonis 24. Liblikõieliste vegetatiivse osa kuivainesisalduse suurenemine taimede infitseerimisel *Rhizobium*'i mitmesuguste tüvedega.

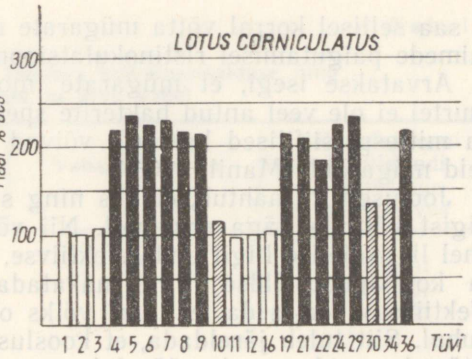
Efektiivseteks tüvedeks osutusid (tabel 18, joonis 21) eranditult kõik ühte ristinokulatsioonirühma kuuluvatelt taimedelt isoleeritud bakteritüved. Lisaks neile andsid efektiivse sümbioosi ka *Lotus*'e rühma moodustavad tüved *(Lotus corniculatus, Anthyllis vulneraria, Tetragonolobus siliquosus) Rhizobium leguminosarum*'i rühma kuuluvate taimedega ja, vastupidi, *Rhizobium leguminosarum*'i hulka kuuluvad tüved *Lotuse*'e rühma taimedega. Kuigi tüve 29 puhul *Lathyrus pratensis*'el ja *Lathyrus maritimus*'el on tabelis 18 märgitud mitteefektiivne sümbioos, oli kuivainesisaldus kontrolli suhtes vastavalt 147% ja 149%. Seepärast võib ka seda liblikõielise — bakteri sümbioosi pidada efektiivseks. Et nende kahe ristinokulatsioonirühma liikmete vahel on inokulatsioonivõime vastastikune, võib *Rhizobium leguminosarum*'i ja *Lotus*'e rühm liita üheks ristinokulatsioonirühmaks.

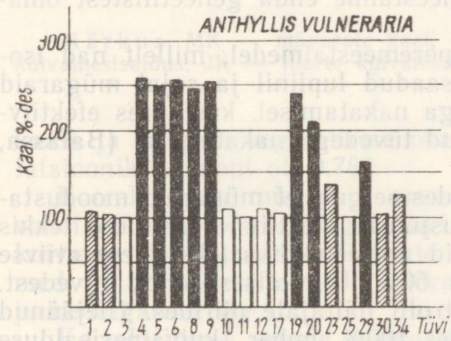
Seni väheuuritud *Ononis repens* kuulub *Rhizobium meliloti* rühma moodustavate taimedega ühisesse rühma ning *Oxytropis pilosa* ja *Caragana arborescens* moodustavad ühise rühma *Astragalus danicus*'ega (tabel 18). Ehkki *Ononis repens*'ilt, *Oxytropis pilosa*'lt ja *Caragana arborescens*'ilt eraldatud tüved 34, 30 ja 11 moodustasid mügaraid ka teistel liblikõielistel (tabel 18), osutusid nad neil juhtudel mitteefektiivseteks. Seepärast

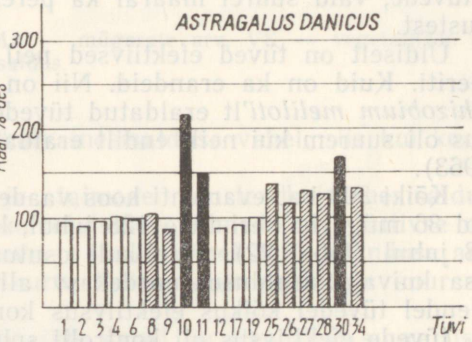


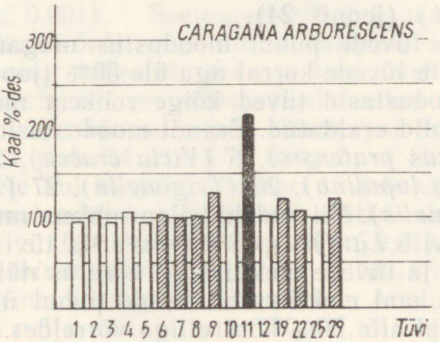
Joonis 25. *Rhizobium*'i eri tüvedega nakatatud liblikõieliste taimede vegetatiivse osa kuivkaal protsentides kontrolli suhtes. Kontrolliks on võetud nakatamata taim. Mustad tulbad vastavad efektiivsele sümbioosile, viirutatud tulbad — mitteefektiivsele sümbioosile, kuna valged tulbad tähistavad katsevariante, milles mügaraid ei moodustunud (tüvede šifrid vt. tabelis 22).


LATHYRUS MARITIMUS
Kaal %-des
300
200
100
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 19 22 29 36
Tüvi


LOTUS CORNICULATUS
Kaal %-des
300
200
100
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 16 19 21 22 24 29 30 34 36
Tüvi


ANTHYLLIS VULNERARIA
Kaal %-des
300
200
100
1 2 3 4 5 6 8 9 10 11 12 17 19 20 23 25 29 30 34
Tüvi


ASTRAGALUS DANICUS
Kaal %-des
300
200
100
1 2 3 4 6 8 9 10 11 12 17 19 25 26 27 28 30 34
Tüvi


CARAGANA ARBORESCENS
Kaal %-des
300
200
100
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 19 22 25 29
Tüvi

ei saa sellisel korral võtta mügarate moodustamise võimet aluseks nende taimede paigutamisel ristinokulatsioonirühmadesse.

Arvatakse isegi, et mügarate moodustamine kindla peremeestaime juurtel ei ole veel antud bakterite spetsiifilisuse näitaja sellel taimel, sest ka mittespetsiifilised bakterid võivad taimedel moodustada mitteefektiivseid mügaraid (Manil, 1963).

Jooniselt 25 nähtub, et üks ning sama tüvi võib sõltuvalt liblikõielise liigist käituda väga erinevalt. Nii võib üks ja sama mügarbakteri tüvi ühel liblikõielise liigil anda efektiivse, teisel aga mitteefektiivse sümbioosi ja kolmandat üldse mitte nakatada. Seepärast ei tähenda tüve mitteefektiivsus veel seda, et ta ei võiks olla efektiivne teise liblikõielise liigi puhul. Siit tuleb järeldada, et koosluse efektiivsus ei olene üksnes bakteritüvede, vaid suurel määral ka peremeestaime enda geneetilistest omadustest.

Üldiselt on tüved efektiivsed neil peremeestaimedel, millelt nad isoleeriti. Kuid on ka erandeid. Nii on saadud lupiinil ja sojal mügaraid *Rhizobium meliloti*'lt eraldatud tüvedega nakatamisel, kusjuures efektiivsus oli suurem kui neilt endilt eraldatud tüvedega nakatamisel (Balassa, 1963).

Kõiki 303 katsevarianti koos vaadeldes selgub, et mügaraid moodustasid 36 mügarbakteri tüve 128 juhul, kusjuures efektiivne sümbioos tekkis 88 juhul (tabel 22). Järelikult osutusid mitteefektiivseteks (vegetatiivse osa kuivainesisalduse juurdekasv alla 50%) $^1/_3$ katses olnud tüvedest. Nendel tüvedel kõikus efektiivsus kontrolli näitajate piirides. Ülejäänud $^2/_3$ tüvede efektiivsus oli kontrolli suhtes 100% ümber (kuivainesisalduse juurdekasv üle 50%) (joonis 24).

Mitteefektiivsete tüvede puhul moodustus mügaraid kontrolli suhtes alla 50%, efektiivsete tüvede korral aga üle 50% (joonised 22 ja 26). Enamikul juhtudel moodustasid tüved kõige rohkem mügaraid peremeestaimedel, millelt nad olid eraldatud. Erandi moodustasid vaid tüved 4 *(Vicia sepium)*, 5 *(Lathyrus pratensis)*, 6 *(Vicia cracca)*, 24 *(Lathyrus pisiformis)*, 25 *(Medicago lupulina)*, 26 *(Trigonella)*, 27 *(Medicago falcata)* ja 28 *(Melilotus officinalis)*. Nii andsid kõige rohkem mügaraid tüvi 4 *Lathyrus pratensis*'el, tüvi 5 *Lathyrus maritimus*'el ja tüvi 6 *Vicia sepium*'il.

Mügarate kaalu ja tüvede efektiivsuse võrdlus näitas, et enamikul juhtudel on mügarate kaal efektiivsete tüvede puhul üle 50% ja mitteefektiivsete tüvede korral alla 50% kontrolliga võrreldes. Ainsaks erandiks oli tüvi 1 *(Medicago sativa)*, mis *Trifolium arvense*'l andis küll mitteefektiivse sümbioosi, kuid mügarate kaal kontrolli suhtes oli üle 50% (joonised 23 ja 27).

Korrelatsioonarvutused (tabel 23) näitasid, et mügarbakterite poolt infitseeritud liblikõieliste taimede vegetatiivse osa kuivainesisaldus on seoses mügarate arvu ja kaaluga. Suhteliselt tugevam oli seos mügarate

Korrelatsioon liblikõieliste taimede kuivainesisalduse ning mügarate kaalu ja arvu vahel

Uuritavad suurused	Korrelatsiooni koefitsiendi väärtus	Vabadusastmete arv	Korrelatsiooni koefitsiendi statistiline usaldatavus
MA, VK	0,696	125	$p < 0,001$
MA, JK	0,589	123	$P < 0,001$
MK, VK	0,782	123	$P < 0,001$

Märkus. MK — mügarate kaal, MA — mügarate arv, VK — vegetatiivse osa kuivainesisaldus, JK — juurte kuivainesisaldus.

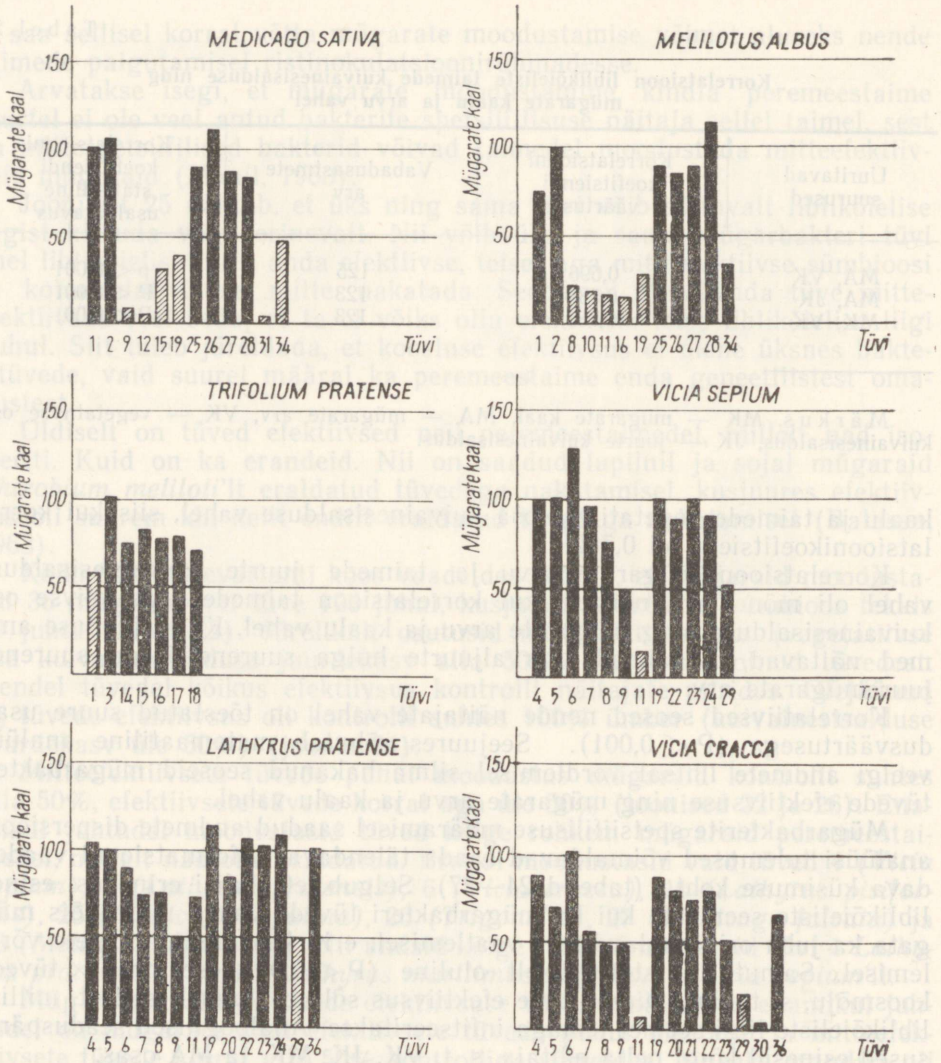
kaalu ja taimede vegetatiivse osa kuivainesisalduse vahel, siis kui korrelatsioonikoefitsient oli 0,782.

Korrelatsioon mügarate arvu ja taimede juurte kuivainesisalduse vahel oli mõnevõrra nõrgem kui korrelatsioon taimede vegetatiivse osa kuivainesisalduse ning mügarate arvu ja kaalu vahel. Ka kirjanduse andmed näitavad, et taimede kõrvaljuurte hulga suurenemisega suureneb juuremügarate arv.

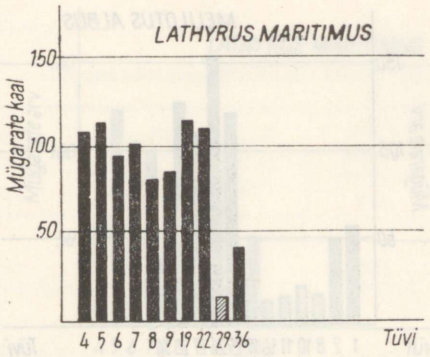
Korrelatiivsed seosed nende näitajate vahel on tõestatud suure usaldusväärtusega ($P < 0,001$). Seejuures rõhutab matemaatiline analüüs veelgi andmete lihtsal võrdlemisel silma hakanud seoseid mügarbakteri tüvede efektiivsuse ning mügarate arvu ja kaalu vahel.

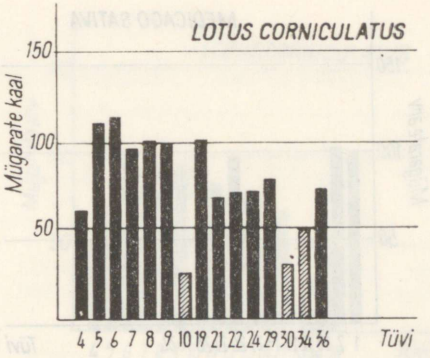
Mügarbakterite spetsiifilisuse määramisel saadud andmete dispersioonanalüüsi tulemused võimaldavad saada täiendavat informatsiooni vaadeldava küsimuse kohta (tabelid 24—27). Selgub, et olulisi erinevusi esineb liblikõieliste seemnete kui ka mügarbakteri tüvede vahel, mida võis märgata ka juba originaalandmete vaatlemisel, eriti keskmiste andmete võrdlemisel. Samuti on statistiliselt oluline ($P < 0,01$) «seemned × tüved» koosmõju, s. t. *Rhizobium*'i tüve efektiivsus sõltub oluliselt sellest, millise liblikõieliste liigi seemet temaga infitseeritakse. Analoogilised seaduspärasused esinesid kõigi nelja näitaja, s. t. VK, JK, MK ja MA osas.

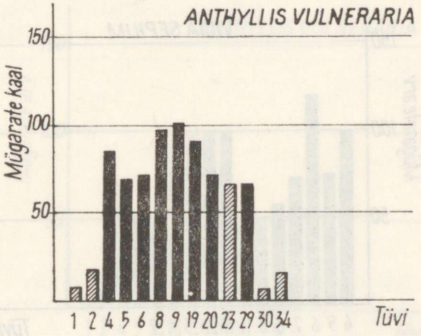
Saadud andmed kinnitavad veelgi, et *Rhizobium*'i tüvede diferentseerimine liikideks ainult mügarate moodustamise võime alusel ei ole õige, vaid kõrvuti sellega tuleb silmas pidada peremeestaime ja mügarbakteri sümbioosi efektiivsust.

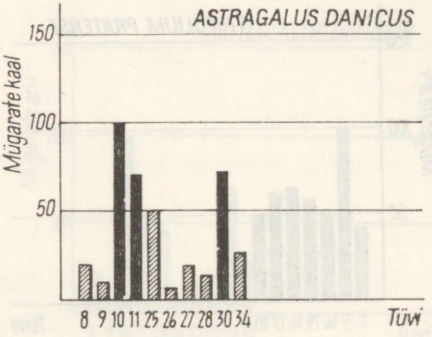


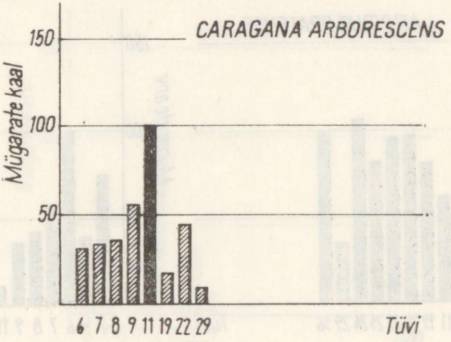
Joonis 26. Mügarate arv *Rhizobium*'i eri tüvedega nakatatud liblikõielistel taimedel protsentides kontrolli suhtes. Kontrolliks on võetud samalt liblikõieliste liigilt eraldatud mügarbakteri tüvega nakatatud taim (tüvede šifrid vt. tabelis 22).

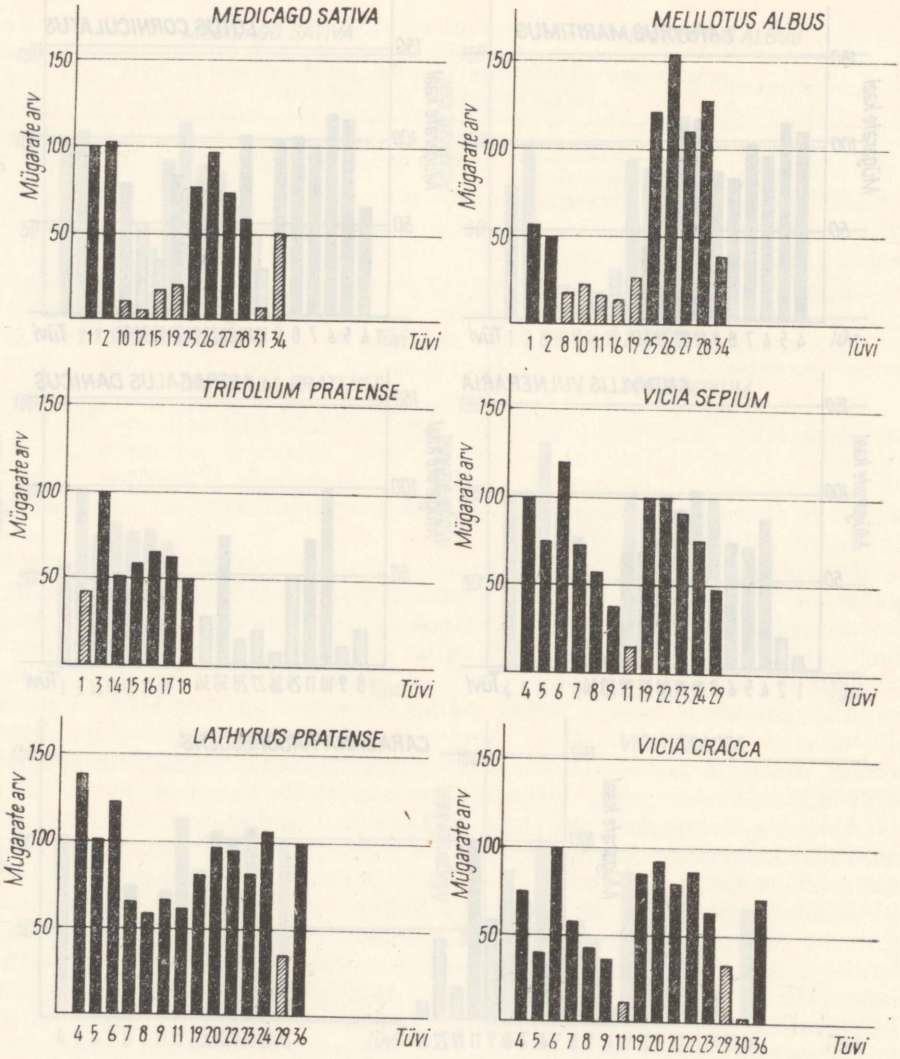

LATHYRUS MARITIMUS
Mügarate kaal
150
100
50
4 5 6 7 8 9 19 22 29 36
Tüvi


LOTUS CORNICULATUS
Mügarate kaal
150
100
50
4 5 6 7 8 9 10 19 21 22 24 29 30 34 36
Tüvi

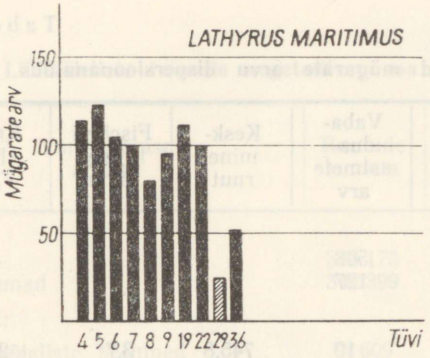

ANTHYLLIS VULNERARIA
Mügarate kaal
150
100
50
1 2 4 5 6 8 9 19 20 23 29 30 34
Tüvi

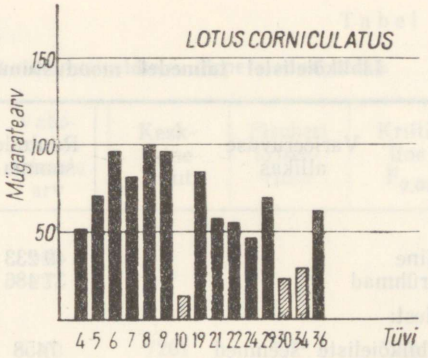

ASTRAGALUS DANICUS
Mügarate kaal
150
100
50
8 9 10 11 25 26 27 28 30 34
Tüvi

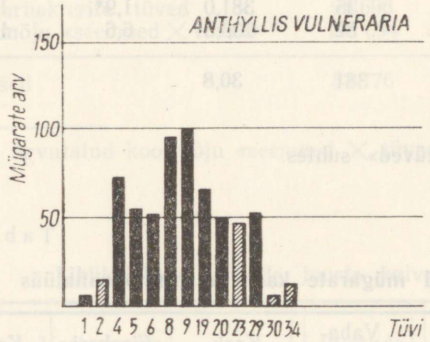

CARAGANA ARBORESCENS
Mügarate kaal
150
100
50
6 7 8 9 11 19 22 29
Tüvi

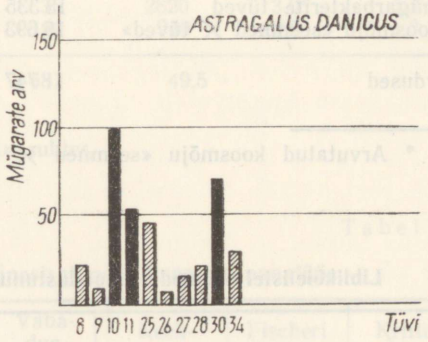


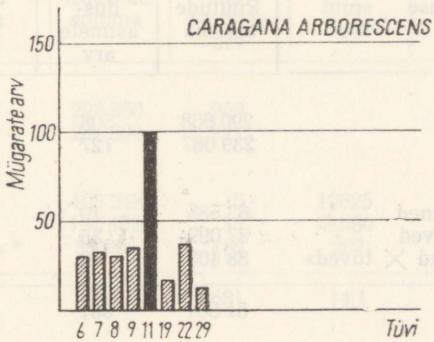
Joonis 27. Mügarate kaal *Rhizobium*'i eri tüvedega nakatatud liblikõielistel taimedel protsentides kontrolli suhtes. Kontrolliks on võetud samalt liblikõieliste liigilt eraldatud nakatatud taim (tüvede šifrid vt. tabelis 22).


LATHYRUS MARITIMUS
150
100
50
Mügarate arv
4 5 6 7 8 9 19 22 29 36
Tüvi


LOTUS CORNICULATUS
150
100
50
Mügarate arv
4 5 6 7 8 9 10 19 21 22 24 29 30 34 36
Tüvi


ANTHYLLIS VULNERARIA
150
100
50
Mügarate arv
1 2 4 5 6 8 9 19 20 23 29 30 34
Tüvi


ASTRAGALUS DANICUS
150
100
50
Mügarate arv
8 9 10 11 25 26 27 28 30 34
Tüvi


CARAGANA ARBORESCENS
150
100
50
Mügarate arv
6 7 8 9 11 19 22 29
Tüvi

Tabel 24

Liblikõielistel taimedel moodustunud mügarate arvu dispersioonanalüüs

Varieeruvuse allikas	Ruutude summa	Vabadusastmete arv	Keskmine ruut	Fischeri kriteerium	Kriitiline $F_{0,01}$
Üldine	49 233	508			
Alarühmad	37 486	127			
Sellest:					
liblikõieliste seemned	7458	10	745,8	3,7*	2,6
mügarbakterite tüved	13 335	35	381,0	1,9*	1,9
koosmõju «seemned × tüved»	16 693	82	203,5	6,6	1,5
Kordused	11 747	381	30,8		

* Arvutatud koosmõju «seemned × tüved» suhtes.

Tabel 25

Liblikõielistel taimedel moodustunud mügarate kaalu dispersioonanalüüs

Varieeruvuse allikas	Ruutude summa	Vabadusastmete arv	Keskmine ruut	Fischeri kriteerium	Kriitiline $F_{0,01}$
Üldine	290 668	508			
Alarühmad	239 087	127			
Sellest:					
liblikõieliste seemned	63 585	10	6358	5,9*	2,6
mügarbakterite tüved	87 099	35	2490	2,3*	1,9
koosmõju «seemned × tüved»	88 403	82	1075	8,0	1,5
Kordused	51 581	381	135		

* Arvutatud koosmõju «seemned × tüved» suhtes.

Tabel 26

Liblikõieliste taimede vegetatiivse osa kuivainesisalduse dispersioonanalüüs

Varieeruvuse allikas	Ruutude summa	Vabadusastmete arv	Keskmine ruut	Fischeri kriteerium	Kriitiline $F_{0,01}$
Üldine	376 175	908			
Alarühmad	342 399	227			
Sellest:					
liblikõieliste seemned	72 609	10	7261	7,7*	2,4
mügarbakterite tüved	98 696	35	2820	3,0*	1,7
koosmõju «seemned × tüved» *	171 094	182	940	19,0	1,3
Kordused	33 776	681	49,5		

* Arvutatud koosmõju «seemned × tüved» suhtes.

Tabel 27

Liblikõieliste taimede juurte kuivainesisalduse dispersioonanalüüs

Varieeruvuse allikas	Ruutude summa	Vabadusastmete arv	Keskmine ruut	Fischeri kriteerium	Kriitiline $F_{0,01}$
Üldine	293 980	908			
Alarühmad	284 394	227			
Sellest:					
liblikõieliste seemned	108 248	10	10825	52,4*	2,4
mügarbakterite tüved	138 462	35	3 950	19,1*	1,7
koosmõju «seemned × tüved» *	37 684	182	207	14,7	1,3
Kordused	9 586	681	14,1		

* Arvutatud koosmõju «seemned × tüved» suhtes.

Kokkuvõte

Esitatud andmetest nähtub, et liblikõieliste seemnete inokuleerimisel mügarbakterite eri tüvedega tekivad mügarad eranditult kõigil peremeestaimedel, mille juuremügaratest nad olid eraldatud. Mügarate hulk ja suurus erines oluliselt looduslikult leiduvatest mügaratest. Enamikul juhtudel ulatus mügarate arv kunstlikes tingimustes kasvatatud liblikõieliste taimede juurtel ainult mõnekümneni ja nende suurus oli 3—5 mm. Looduslikes tingimustes kasvavate taimede juurtel aga võib mügarate arv ulatuda sadadeni ja suurus on 5—10 mm.

Medicago sativa seemnete infitseerimisel mügarbakterite 33 eri tüvega moodustasid mügaraid 12 tüve. Kõige rohkem mügaraid (keskmiselt 26 mügarat) moodustasid need tüved, mis olid isoleeritud *Medicago sativa*'ga samasse ristinokulatsioonirühma kuuluvatelt taimede juuremügaratest. *Rh. lupini, Rh. trifolii, Rh. leguminosarum*'i ja *Rh. simplex*'i ristinokulatsioonirühmadesse kuuluvatelt taimedelt eraldatud tüvede poolt moodustatud mügarate arv oli aga tunduvalt väiksem (keskmiselt 6 mügarat).

Huvitavad tulemused saadi *Ononis repens*'i juuremügaratest eraldatud tüve (34) korral. Nimetatud tüvi moodustas küllaltki suurel hulgal mügaraid *Medicago sativa*'l (16 mügarat) ja teisel sama ristinokulatsioonirühma taimel — *Melilotus albus*'el (9 mügarat). Samuti olid need mügarad kõrge efektiivsusega. Lähtudes nendest andmetest võib teha järelduse, et *Ononis repens*'ilt eraldatud tüvi 34 kuulub *Rh. meliloti* hulka ning liblikõieline ise kuulub *Medicago sativa* ja *Melilotus albus*'ega samasse ristinokulatsioonirühma.

Ka *Lotus corniculatus*'elt ja *Caragana arborescens*'ilt eraldatud tüved (8 ja 11) olid võimelised infitseerima *Melilotus albus*'t, kusjuures tekkis väikesearvuliselt mitteefektiivseid mügaraid.

Trifolium pratense'l moodustas (kõrvuti ristiku liikidelt eraldatud tüvedega) mügaraid ka *Medicago sativa* juuremügaratest isoleeritud tüvi. Ehkki need mügarad olid mõõtmetelt väga väikesed ja mitteefektiivsed, on nimetatud fakt huvitav sellepärast, et ristikute rühma on peetud kõige selgemini väljakujunenud spetsiifilisusega mügarbakterite rühmaks.

Rh. leguminosarum'i ristinokulatsioonirühma kuuluvate taimede juurtel moodustatud mügaraid *Caragana arborescens*'i (tüvi 11) ja *Oxytropis pilosa* (tüvi 30) poolt tuleb vaadelda kui juhuslikku nähtust, sest mügaraid moodustus ainult veerandil või pooltel juhtudest.

Lotus corniculatus'el ja *Anthyllis vulneraria*'l moodustasid mügaraid kõik *Rh. leguminosarum*'i ristinokulatsioonirühma kuuluvatelt taimedelt eraldatud tüved (4, 5, 6, 7, 19, 21, 22, 24). Lisaks neile tüvedele mügardas nimetatud liblikõielisi taimi ka *Tetragonolobus siliquosus*'elt eraldatud tüvi 29. See fakt on järjekordseks kinnituseks Fredi ja teiste uurijate arvamusele (1932), mille järgi need kolm liblikõielist kuuluvad ühte rühma.

Et *Lotus corniculatus*'e, *Anthyllis vulneraria* ja *Tetragonolobus siliquosus*'e juuremügaratest eraldatud tüved andsid efektiivse sümbioosi *Rhizobium leguminosarum*'i rühma kuuluvate taimedega ning, vastupidi, *Rhizobium leguminosarum*'i hulka kuuluvad tüved *Lotus*'e rühma taimedega, siis võiks need kaks rühma liita üheks ristinokulatsioonirühmaks. *Lotus*'e rühma taimedelt eraldatud mügarbaktereid aga võib pidada liigiks *Rh. leguminosarum.*

Astragalus danicus'el moodustasid mügaraid 30-st katses olnud tüvest 10 tüve, kusjuures *Rh. meliloti* hulka kuuluvad tüved ning ka *Lotus corniculatus*'elt, *Anthyllis vulneraria*'lt, *Caragana arborescens*'ilt ja *Ononis repens*'ilt eraldatud tüved. Efektiivse sümbioosi andsid ainult kolm tüve, mis olid eraldatud *Astragalus danicus*'e, *Caragana arborescens*'i ja *Oxytropis pilosa* juuremügaratest.

Caragana arborescens'il andsid mügaraid 8 tüve 25-st, kusjuures sümbioos oli efektiivne oma, s. o. *Caragana arborescens*'i juuremügaratest isoleeritud tüvega nakatamisel.

Tundub tõenäolisena, et *Oxytropis pilosa* ja *Caragana arborescens* moodustavad ühise rühma *Astragalus danicus*'ega. Kuigi *Oxytropis pilosa*'lt ja *Caragana arborescens*'ilt eraldatud tüved 34 ning 30 moodustasid mügaraid ka teistel liblikõieliste liikidel, osutusid need tüved neil juhtudel mitteefektiivseteks. Ei saa sellisel korral võtta mügarate moodustamise võimet aluseks nende taimede paigutamisel ristinokulatsioonirühmadesse.

Tüved *Glycine hispida*'lt (13), *Ornithopus sativus*'elt (32), *Phaseolus vulgaris*'elt (33) ja *Genista*'lt (35), mis ei moodustanud mügaraid ühelgi katses olnud liblikõieliste liigil, ei kuulu ühessegi eelnimetatud ristinokulatsioonirühma. Need tüved kas moodustavad iseseisvad ristinokulatsioonirühmad või liituvad mõningate ühiste ristinokulatsioonirühmadega.

Järelikult võib üks ja sama tüvi sõltuvalt liblikõieliste liigist käituda väga erinevalt: ühel liblikõieliste liigil annab efektiivse, teisel mitteefektiivse sümbioosi, kolmandat aga ei nakata üldse. Kirjanduses leidub ka andmeid (E. Allen, 1949), mille järgi mõned bakteritüved kutsuvad esile esialgu mitteefektiivse sümbioosi, hiljem aga muutub sümbioos efektiivseks. See hiljem avalduv efektiivsus (autorite poolt esitatud andmetel) ei põhine saastumisel. Ta võis peegeldada mingit kriitilist muutust keskkonnatingimustes, mis mõjutavad peremeestaime-bakteritüve sümbioosi. Kuid ekseperimendi käigus võis leida aset ka sümbiontide adaptatsioon teineteise suhtes. Kahjuks ei teostatud vastavaid reinokulatsioonikatseid.

Üldiselt on tüved efektiivsed neil peremeestaimedel, millelt nad on isoleeritud, kusjuures efektiivsus on seotud suure arvu mügarate moodustumisega taimede juurtel. Mügarate kaal on efektiivse sümbioosi korral üle 50% kontrolliga võrreldes, mitteefektiivse sümbioosi puhul aga alla 50%. Korrelatiivsed seosed nende näitajate vahel on tõestatud kõrge usaldusväärsusega ($P < 0{,}001$).

III. KATSETULEMUSTE ARUTELU

Töös esitatud andmed annavad ülevaate *Rhizobium*'i levikust Eesti NSV-s kasvavatel liblikõielistel, faktoreist, millega nimetatud bakterite arvukus mullas suuremal või vähemal määral korreleerub, bakterite morfoloogilistest ja füsioloogilistest omadustest ning mügarbakterite ja liblikõieliste taimede vahelisest sümbioosist. Saadud tulemuste põhjal võib teha täiendusi tänapäeval kasutuselolevates Krassilnikovi (1949) ja Bergey (1957) *Rhizobium*'i klassifikatsioonides, kus mügarbakterite tüvede liigitamine toimub ainult ühe kriteeriumi — mügarate moodustamise võime alusel.

Pealegi on mügarate moodustamise võime omadus, mida bakterid võivad kaotada (ja ka omandada), kui neid kasvatada *in vitro* (Jensen, 1958).

Missugune kriteerium annaks aluse liigitada bakterite tüvesid, mida on 80 aasta jooksul isoleeritud mitmesajalt liblikõielise liigilt? Meie uurimistulemused kinnitavad neid kirjanduses toodud seisukohti, kus märgitakse, et *Rhizobium*'i perekonna liikide määramisel ei saa aluseks võtta üksnes nende nakatusvõimet, vaid tuleb arvestada ka kõiki teisi (morfoloogilisi, füsioloogilisi, biokeemilisi, seroloogilisi jne.) omadusi (Leifson ja Erdman, 1958; Smith, 1958; Manninger, 1962; Graham, 1964; Ley jt., 1965).

Meie uurimised, mis haarasid 58% Eesti NSV-s kasvavaid liblikõieliste liike, näitasid, et kõigil vaatluse all olnud liblikõielistel leidus mügaraid. Mügarad asetsesid nii pea- kui ka külgjuurtel.

Mügarate morfoloogia uurimisel selgus, et samasse liblikõieliste perekonda kuuluvatel liikidel oli mügarate kuju ja suurus sageli erinev; nii leiti *Trifolium*'i liikidel ümmargusi ja kepikujulisi (suurus 0,5—1,5 mm) ning *Vicia* ja *Lathyrus*'e liikidel ümmargusi, nuia- ja käpakujulisi mügaraid (suurus 1,5—8,0 mm). *Tetragonolobus*'e, *Lotus*'e, *Oxytropis*'e, *Ononis*'e ja *Anthyllis*'e perekonnas olid ainult ümmargused (suurus 0,5—4,0 mm) ning *Medicago* perekonnas ainult käpakujulised mügarad (suurus 1,5—3,5 mm).

Mügarate kuju ja suurus huvitas neid kui võimalik abikriteerium mügarbakterite klassifitseerimisel. Selgus aga, et liblikõieliste juurtel leidu-

vate mügarate morfoloogia varieerub tublisti nii ühe ja sama perekonna kui ka liigi piirides.

Meie uurimiste tulemused kinnitasid neid kirjanduses toodud seisukohti, kus rõhutatakse ühelt poolt mullastikutingimuste ja teiselt poolt liblikõieliste taimede mõju mügarbakterite võimele moodustada mügaraid (Bjälfve, 1937; Rassel, 1955; Petrosjan, 1959). Näiteks selgus, et liblikõieliste taimede kasv oleneb nende juuremügarate arvust ja mulla reaktsioonist, kusjuures mügarate arv omakorda on korrelatsioonis mulla reaktsiooni ning difosforpentoksiidi- ja kaaliumoksiidisisaldusega mullas. Kõige rohkem mügaraid moodustub neutraalse kuni leeleka reaktsiooniga (pH_{KCl} 6,8—7,2) lubjarikastes muldades, kus kergesti lahustuvate difosforpentoksiidi- ja kaaliumoksiidisisaldus on kõrge.

Liblikõielistelt taimedelt eraldatud mügarbakterid võib suhtumise järgi mulla reaktsioonisse jaotada kahte suurde rühma. Esimese rühma moodustavad need bakterid, mis kasvavad laias pH piirkonnas. *Vicia sylvatica* juurtel leiti mügaraid mullast, mille pH_{KCl} oli 4,6—7,1, *Lotus corniculatus*'e juurtel mullast, mille pH_{KCl} oli 4,7—7,0 jne. Teise rühma kuuluvad kitsas pH piirkonnas kasvavad mügarbakterid, mida leiti *Ononis repens*'il pH_{KCl} 6,8—7,2 puhul, *O. arvensis*'el pH_{KCl} 6,8—7,3 korral, *Anthyllis vulneraria*'l pH_{KCl} 7,0—7,4 korral ja *Medicago lupulina*'l pH_{KCl} 6,9—7,3 puhul. Siit ilmneb, et mulla pH suhtes on kõige tundlikumad *Medicago, Ononis*'e ja *Anthyllis*'e liikidel arenevad mügarbakterid ja kõige resistentsemad on nad *Vicia, Trifolium*'i, *Lathyrus*'e ning *Lotus*'e liikidel.

Analoogilisi seisukohti on väljendanud Mulder jt. (1966) oma mõnevõrra hiljem avaldatud töös. Nad märgivad mügarate puudumist *Med. lupulina*'l, kui mulla pH oli alla 6,5, *Trif. repens*'il aga moodustusid mügarad isegi pH 5,0 puhul.

Meie uurimistulemustest tuleb esmajoones esile tõsta mügarate esinemise selgitamist metsikult kasvavate liblikõieliste liikidel, nagu *Ononis arvensis (O. repens), Melilotus dentatus, Trifolium spadiceum, Trif. strepens, Trif. alpestre, Tetragonolobus siliquosus, Anthyllis vulneraria, Caragana arborescens, Astragalus danicus, Oxytropis pilosa, Vicia cassubica, V. tetrasperma, Lathyrus maritimus, Lath. niger.* Mügarate esinemist nende taimede juurtel on varem vähe või ei ole üldse uuritud.

Nagu juba kirjanduse ülevaatest selgus, on andmed mügarate esinemise või mitteesinemise kohta liblikõielistel taimedel väga puudulikud. Peamised raskused on selles, et paljud liblikõieliste liigid kasvavad kaugetel eraldatud aladel ja on kogujatele raskesti kättesaadavad. Osa liblikõieliste perekondi on aga monotüübilised ja on keskpärasele botaanikule vaevalt tuntud, rääkimata mikrobioloogidest. Ka seemnete kogumine on seotud suurte raskustega, sest paljud seemned on suhteliselt lühikese elueaga. Seega jätab viis, kuidas saab uurida mügarate esinemist liblikõielistel, palju soovida. Tihedam koopereerumine botaanikute ja mikrobio-

loogide vahel, kes on huvitatud liblikõielistest taimedest, võimaldaks saada palju väärtuslikku informatsiooni ning ergutaks agronoomilist huvi teatud taimede selektsiooniks ja adaptatsiooniks põllumajanduslikel eesmärkidel.

Mügaratest isoleeritud mügarbakterite tüved varieeruvad morfoloogilistelt tunnustelt suhteliselt vähe. Nende üldine sarnasus ei võimalda neid rühmitada niivõrd üksikuteks mügarbakterite liikideks, kuivõrd peremeestaimede järgi. Seda laadi erinevused piirduvad väikeste variatsioonidega keskmistes mõõdetes, liikuvusastmes ja kolooniate kasvu intensiivsuses eri söötmetel.

Kõige olulisem ja stabiilsem tunnus on kolooniate moodustamise kiirus kasvamisel kunstlikel söötmetel. Nimelt jagunevad kõik mügarbakterikultuurid kiiresti ja aeglaselt kasvavateks tüvedeks. Kõige selgepiirilisemad erinevused morfoloogiliste, füsioloogiliste ja biokeemiliste näitajate vahel tulevad ilmsiks just sellise mügarbakterite tüvede jaotuse korral.

Nii moodustavad peaaegu kõik kiiresti kasvavad tüved oa-agaril, MBP-1 ja MBP-1 kongo punasega ümmargusi poolläbipaistvaid hallikasvalgeid pealt kumeraid limase konsistentsiga kolooniaid, diameetriga 1,0—8,0 mm. Kõik aeglaselt kasvavad tüved annavad väikesi (läbimõõt 0,2—2,0 mm) ümmargusi poolläbipaistvaid piimjasvalgeid ja hästi läikiva, opalestseeruva pinnaga kolooniaid.

Veelgi selgemini tulevad erinevused nende kahe põhirühma vahel ilmsiks elektronmikroskoopilistes uurimistes, mis on näidanud, et kõik aeglaselt kasvavate tüvede rakud on ühe, subpolaarselt kinnitunud viburiga (monotrihhid), vastandina kiiresti kasvavatele tüvedele, millel viburid on kinnitunud kogu raku pinnale (peritrihhid).

Ka kultiveerimisel lakmuspiimas annavad kiiresti ja aeglaselt kasvavad *Rhizobium*'i tüved iseloomulikke reaktsioone: kiiresti kasvavate tüvede korral moodustub lakmuspiimas kas aluseline või happeline reaktsioon «seerum»-tsooniga või ainult happeline reaktsioon ilma «seerum»-tsoonita. Kõik aeglaselt kasvavad tüved aga annavad samades tingimustes tugeva aluselise reaktsiooni, kuid ei moodusta «seerum»-tsooni.

Nii nagu morfoloogiliste ja füsioloogiliste näitajate puhul, jagunevad uuritud *Rhizobium*'i tüved ka biokeemilise tunnuse (süsivesikute fermenteerimine) järgi kaheks rühmitiseks, mille erinevused moodustavad põhilise osa kõigist tüvedevahelistest lahkuminekutest. Lahkuminekud nende kahe rühmitise vahel on kindlapiirilised ja erinevuste olulisus on statistiliselt tõestatud. Katsed on näidanud, et aeglaselt kasvavate lupiini, soja, seradella ja *Genista* tüvede (üks rühmitis) poolt süsivesikute fermenteerimisel moodustub aluseline keskkonna reaktsioon. Teise rühmitise moodustavad kõik kiiresti kasvavad bakteritüved, mille toimel süsivesikute lagundamisel tekivad happed.

Kirjeldatud erinevusi aeglaselt ja kiiresti kasvavate tüvede vahel võib pidada kõige iseloomulikumateks tunnusteks mõlemale rühmale.

Teoreetilisest seisukohast on antud töös kõige huvipakkuvam moment hapete või aluselise reaktsiooni moodustumine süsivesikute fermenteerimisel *Rhizobium*'i poolt.

Meil õnnestus näidata *Rhizobium*'i liikide võrdlemisel Dunkani testi abil, et nad jagunevad süsivesikute fermenteerimisel moodustunud keskmise hapete hulga järgi neljaks rühmaks. Ühtlasi selgus, et selline jaotus langeb põhijoontes kokku Smithi (1958) poolt antud mügarbakterite klassifikatsiooniga. Meie poolt märgitud erinevusteks on esiteks see, et *Rh. meliloti* tüvede hulka kuuluvad ka tüved, mis eraldatakse *Ononis repens*'ilt, *Lotus corniculatus*'elt, *Anthyllis vulneraria*'lt ja *Tetragonolobus siliquosus*'elt, teiseks, et *Rh. phaseoli*, *Rh. leguminosarum*'i ja *Rh. trifolii* rühma kuulub ka tüvi *Onobrychis viciifolia*'lt ning kolmandaks, et lisaks Smithi (1958) poolt toodud kolmele rühmale on meil lisaks veel neljas rühm, mille moodustavad *Oxytropis pilosa*'lt ja *Astragalus danicus*'elt eraldatud tüved.

Analüüsides *Rhizobium*'i liikide jagunemist mis tahes rühmas happe moodustamise keskmise võime järgi eri süsivesikutest ilmneb, et sellel on tugev seos peremeestaime triibusega. Ühe ja sama triibuse taimedelt eraldatud *Rhizobium*'i tüved kuuluvad happe moodustamise võime järgi peaaegu eranditult ühte ja samasse rühma.

Antud nähtuse seletamisel jagame Norrise (1965) seisukohti. Norris märkis, et hapete moodustamine *Rhizobium*'i poolt on seotud kindlate peremeestaimede triibustesse kuuluvate liblikõieliste evolutsioonilise arenemisega. Need mügarbakterite tüved, mille peremeestaimed kuuluvad evolutsiooniliselt noorematesse triibustesse, on happemoodustajad, vastandina neile tüvedele, mis süsivesikute fermenteerimisel moodustavad aluselise reaktsiooni ja on isoleeritud kõige primitiivsematelt ning morfoloogiliselt kõige vähem spetsialiseerunud liblikõielistelt.

Käesolevas uurimises saime samuti andmeid selle kohta, et süsivesikutest fermenteeritakse kõige paremini arabinoosi, galaktoosi, glükoosi, sahharoosi ja manniiti. Kõige halvemini fermenteeritakse maltoosi, sorbiiti ja inosiiti. Laktoos moodustas vahepealse rühma.

Toodust tuleneb praktilist laadi järeldus: kui siiani soovitati söötmes mügarbakteritele kasutada energiaallikana manniiti, siis niisama hästi või isegi edukamalt võib manniidi asemel võtta söötmesse arabinoosi, galaktoosi, glükoosi või sahharoosi, seejuures silmas pidades söötme selektiivsust.

Mikrovegetatsioonikatsed, mis korraldati selleks, et kinnitada mügarbakterite tüvede spetsiifilisust ja mügarate moodustamise võimet, näitasid selgesti tüvede omadust tekitada mügaraid identselt neile bakteritele, mis

moodustasid mügaraid looduslikes tingimustes kasvavatel peremeestaimedel.

Siinkohal on huvitav märkida mõningaid momente, millega puutusime kokku liblikõieliste taimede infitseerimise katsetes *Rhizobium*'i eri tüvedega. Nimelt selgus, et väga paljudel eri ristinokulatsioonirühmadesse kuuluvatel taimedel nende nakatamisel võõra *Rhizobium*'i liigiga moodustusid mügarad, kusjuures need olid kas efektiivsed või mitteefektiivsed. Nii moodustusid mitteefektiivsed mügarad *Medicago sativa*'l ja *Melilotus albus*'el, kui need infitseeriti *Vicia faba*'lt eraldatud tüvega, *Trifolium pratense*'l tekkisid mitteefektiivsed mügarad nakatamisel *Medicago sativa*'lt isoleeritud tüvedega jne. Efektiivsed mügarad moodustusid aga *Medicago sativa*'l ja *Melilotus albus*'el, kui neid infitseeriti *Ononis repens*'i juuremügaratest eraldatud tüvedega. Ka tüved *Lotus corniculatus*'elt, *Anthyllis vulneraria*'lt ja *Tetragonolobus siliquosus*'elt andsid efektiivse sümbioosi *Rh. leguminosarum*'i rühma kuuluvate taimedega. Järelikult kuuluvad *Ononis repens*'i juuremügaratest eraldatud bakterid ühisesse liiki *Rh. meliloti*'ga ja *Lotus*'e rühma bakterid ühisesse liiki *Rh. leguminosarum*'iga. Seda järeldust kinnitavad ka morfoloogilised, füsioloogilised ja biokeemilised näitajad.

Nagu meie katsed näitasid, võib üks ja sama tüvi käituda väga erinevalt sõltuvalt liblikõielise liigist. Nii võib üks ja sama mügarbakterite tüvi ühel liblikõieliste liigil anda efektiivse ja teisel mitteefektiivse sümbioosi, kolmandat aga üldse mitte nakatada. Seepärast võib mitteefektiivne tüvi olla teisele liblikõieliste liigile efektiivne. Mõistetel efektiivne ja mitteefektiivne on mingi *Rhizobium*'i tüve puhul väärtust ainult seoses kindla partneriga. Vastasel juhul on need terminid sisutud ja võivad viia eksiteele.

Neil kaalutlustel asub autor seisukohale, et usaldusväärsete erinevuste otsimine *Rhizobium*'i eri tüvede spetsiifilisuse näitajates on õigustatud ainult neil juhtudel, kui infitseerimise tulemusel tekkinud sümbioos kindla peremeestaime ja *Rhizobium*'i tüve vahel on efektiivne. Siit tuleneb loogilise järeldusena, et mügarbakterite infektsioon, mügarate moodustamine, sümbioos ja õhulämmastiku sidumine sõltuvad suurel määral spetsiifilistest suhetest peremeestaime ja *Rhizobium*'i tüve vahel, mis on äärmiselt keeruline ning sõltub niihästi peremeestaime kui ka bakterite geneetilistest omadustest ja keskkonnatingimustest.

Uurimistulemused tõendavad korrelatiivsete seoste olemasolu mügarbakterite poolt infitseeritud liblikõieliste taimede vegetatiivse osa kuivainesisalduse ning mügarate arvu ja kaalu vahel. Nimetatud seostele viitab kõige ilmekamalt asjaolu, et mitteefektiivsete tüvede puhul moodustunud mügarate arv ja kaal kontrolli suhtes oli alla 50%. Efektiivsete tüvede korral aga oli mügarate arv ja kaal üle 50%.

Infitseeritud liblikõieliste taimede saagi andmed näitasid, et kuivaine-

sisaldus osutub efektiivse sümbioosi puhul peaaegu absoluutse reeglipärasusena infitseerimata taimede kuivainesisaldusest kõrgemaks. See viib praktiliselt järeldusele, et nitragiini tootmine peab baseeruma kohalikel tüvedel, sest viimased on kõige paremini kohanenud antud geograafilise asukoha mullastikuga ja teiste tingimustega. Ainult sel juhul on võimalik saada meie põldudel liblikõieliste kasvatamisel suuri saake.

JÄRELDUSED

1. On saadud andmed mügarate esinemise kohta Eestis kasvavatel liblikõielistel, mis esindavad 46 liiki 16 perekonnast (kokku 690 taime).

a) Mügarad paiknevad kogu juuresüsteemil, kusjuures külgjuurtel on nende esinemissagedus suurem kui peajuurel.

b) Mügarad erinevad üksteisest suuruse ja arvu poolest. Erinevused on tingitud ühelt poolt liblikõielise perekonnast ja liigist, teiselt poolt mullaerimist, mulla reaktsioonist, kergesti lahustuvate difosforpentoksiidi ja kaaliumoksiidi sisaldusest mullas.

c) Mügarate värvus oleneb vanusest. Noored mügarad on tavaliselt valged, roosakasvalged või punakaspruunid. Vananedes muutuvad nad pruuniks või pruunikasmustaks.

2. Liblikõieliste juuremügaratest isoleeritud *Rhizobium*'i tüved varieeruvad morfoloogilis-füsioloogilistelt tunnustelt ja kultuuriomadustelt vähe ning nende üldine sarnasus ei võimalda neid rühmitada mitte niivõrd üksikute mügarbakterite liikide kuivõrd peremeestaimede järgi.

a) Kõik uuritud bakteritüved on gramnegatiivsed.

b) Rakkude pikkus varieerub olenevalt peremeestaime liigist 1,0—3,5 μm ja läbimõõt 0,3—0,9 μm piirides.

c) Kolooniate moodustamise kiiruse järgi kunstlikel söötmetel jagunevad uuritud bakteritüved kahte põhirühma: kiiresti ja aeglaselt kasvavad. Aeglaselt kasvavateks osutusid *Ornithopus sativus*'e, *Lupinus luteus*'e, *Soja* ja *Genista* juuremügaratest isoleeritud tüved. Ülejäänud 34 tüve kuuluvad kiiresti kasvavate hulka.

d) Kõik aeglaselt kasvavate tüvede rakud on ühe subpolaarselt kinnitunud viburiga (monotrihhid). Kultiveerimisel lakmuspiimas annavad nad tugeva aluselise reaktsiooni, kuid ei moodusta «seerum»-tsooni. Želatiini nad ei veelda.

Kiiresti kasvavatel bakteritüvedel on viburid kogu raku pinnal (peritrihhid). Kasvatamisel lakmuspiimas tekitavad nad kas aluselise reaktsiooni «seerum»-tsooniga, happelise reaktsiooni «seerum»-tsooniga või ainult happelise reaktsiooni ilma «seerum»-tsoonita. Želatiini veeldasid *Melilotus*'elt, *Medicago*'lt, *Phaseolus vulgaris*'elt, *Ononis repens*'ilt, *Lotus corniculatus*'elt, *Anthyllis vulneraria*'lt ja *Tetragonolobus siliquosus*'elt

eraldatud tüved. Viimase kolme tüve puhul täheldati nõrka želatiini veeldumist pärast neljanädalast inkubatsiooni ainult söötme ülemises osas. Teiste tüvede korral veeldus kogu želatiin.

e) Kõik *Rhizobium*'i tüved fermenteerisid kõiki katses kasutatud süsivesikuid (arabinoosi, galaktoosi, glükoosi, mannitooli, sahharoosi, laktoosi, maltoosi, sorbitooli, inositooli, dultsitooli). Fermentatsioonil võib tekkida nii happeline kui ka aluseline reaktsioon. Süsivesikute fermenteerimisel tekkiva keskkonnareaktsiooni ja selle muutumise dünaamika järgi jagunevad *Rhizobium*'i tüved kahte rühma: I — kiiresti kasvavad tüved (moodustavad süsivesikute lagundamisel happeid), II — aeglaselt kasvavad tüved (kutsuvad esile peamiselt aluselise reaktsiooni). Happe moodustumise intensiivsuse järgi jagunevad kiiresti kasvavad tüved omakorda kaheks rühmaks: 1) mõõdukad (26 tüve), mis moodustavad kahe nädala jooksul 14—45 µg-ekv. hapet 1 milj. bakteriraku kohta, ja 2) intensiivsed (8 tüve), mis moodustavad sama aja jooksul 60—75 µg-ekv. hapet 1 milj. bakteriraku kohta.

Aeglaselt kasvavate tüvede poolt süsivesikute fermenteerimisel tekkinud aluseline keskkonna reaktsioon süveneb teatava aja vältel, mille kestus oleneb kasutatud süsivesikust, pidurdub siis ja muutub happeliseks (arabinoosi, galaktoosi ja glükoosi fermenteerimisel).

f) Fermenteerimisel moodustuv hapete hulk oleneb kasutatavast süsivesikust. Kõige rohkem hapet tekib arabinoosi, galaktoosi, glükoosi, sahharoosi ja mannitooli ning kõige vähem maltoosi, sorbitooli ja inositooli fermenteerimisel. Vahepealse rühma moodustab laktoos.

3. Hapete moodustamise keskmise võime alusel ilmneb *Rhizobium*'i liikide rühmitise ja vastava peremeestaime triibuse vahel seos; ühe ja sama triibuse taimedelt eraldatud *Rhizobium*'i tüved kuuluvad happe moodustamise võime järgi peaaegu eranditult ühte ja samasse rühma.

4. Liblikõieliste kasv oleneb juuremügarate arvust, kusjuures mügarate arv omakorda on korrelatsioonis mulla reaktsiooniga ning difosforpentoksiidi- ja kaaliumoksiidisisaldusega mullas. Liblikõieliste taimede vegetatiivse osa ning juurte kuivainesisaldus on korrelatsioonis mügarate arvu ja kaaluga.

5. Vaatluse all olnud liblikõieliste mügarbakterid võib suhtumiselt mulla reaktsioonisse jaotada kahte rühma: I — *Vicia*, *Lathyrus*'e, *Trifolium*'i ja *Lotus*'e liikidel leitud mügarbakterid kasvavad laias pH piirkonnas (pH_{KCl} 4,6—7,1); II — *Medicago*, *Ononis*'e ja *Anthyllis*'e liikidel elunevad mügarbakterid kasvavad kitsas pH piirkonnas (pH_{KCl} 6,8—7,4).

6. Liblikõieliste taimede nakatamisel mügarbakteritega, mis on eraldatud samalt liigilt, tekib alati efektiivne sümbioos. Liblikõieliste nakatamisel teiselt liigilt eraldatud mügarbakteritega moodustuvad sageli juuremügarad, kuid sümbioos osutub tihti mitteefektiivseks. Tavaliselt tekib efektiivne sümbioos teiselt liigilt eraldatud mügarbakteritega ainult siis,

kui see taim, millelt antud mügarbakteri tüvi oli eraldatud, kuulub nakatatava liblikõielise liigiga samasse ristinokulatsioonirühma.

7. *Rhizobium*'i senised klassifikatsioonid ei vasta tema tüvede rühmitamisele biokeemiliste omaduste ega nakatusvõime järgi.

a) Süsivesikute fermenteerimisel võib osa sama liigi tüvedest kuuluda mõõdukate, osa aga intensiivsete happemoodustajate rühma. Võrreldes keskmist happe moodustamise võimet *Rhizobium*'i eri liikidel ilmneb, et *Rh. phaseoli*, *Rh. trifolii* ja *Rh. leguminosarum* ei erine üksteisest, vaid kuuluvad ühisesse rühma (keskmine hapete moodustamise võime 40 µg-ekv.). Nendest vähem produtseerivad hapet *Rh. meliloti* tüved, mis koos *Ononis*'e, *Tetragonolobus*'e, *Lotus*'e ja *Anthyllis*'e tüvedega moodustavad teise rühma (keskmine hapete moodustamise võime 20 µg-ekv.). Kolmandasse rühma kuuluvad eriti intensiivsed *Astragalus*'e ja *Oxytropis*'e tüved (keskmine hapete moodustumise võime 70 µg-ekv.). *Onobrychis viciifolia*'lt eraldatud tüvi kuulub esimese ja teise rühma vahepealsesse rühma (keskmine hapete moodustamise võime 32 µg-ekv.).

b) Efektiivse sümbioosi andsid *Lotus*'e rühma tüved *Rhizobium leguminosarum*'i rühma kuuluvatel taimedel ja, vastupidi, *Rh. leguminosarum*'i alla kuuluvad tüved *Lotus*'e rühma taimedel. Selle põhjal peab nähtavasti *Rh. leguminosarum*'i ja *Lotus*'e rühma liitma üheks ristinokulatsioonirühmaks ning *Lotus*'e rühma taimede juuremügaratest eraldatud bakterid paigutama *Rh. leguminosarum*'i alla.

c) Seni vähe uuritud *Ononis repens*'ilt eraldatud mügarbakterite tüvi kuulub *Rhizobium meliloti* alla ning liblikõieline ise kuulub *Medicago sativa* ja *Melilotus albus*'ega ühisesse ristinokulatsioonirühma.

d) *Oxytropis pilosa* ja *Astragalus danicus* moodustavad efektiivse sümbioosi alusel ühise ristinokulatsioonirühma. Nende mügarbaktereid ei ole võimalik paigutada infitseerimiskatsete ega ka biokeemilise omaduse järgi ühegi *Rhizobium*'i liigi alla, mis on toodud määrajates. Nad moodustavad iseseisva rühma.

8. Eespool toodud andmed näitavad, et mügarbakterite tüvede diferentseerimine morfoloogilis-füsioloogiliste ja biokeemiliste omaduste ning nende võime alusel moodustada mügaraid liblikõielistel taimedel ei vasta *Rhizobium*'i kasutuselolevatele klassifikatsioonidele peremeestaimede ristinokulatsioonirühmade järgi. Ühes ja samas *Rhizobia* liigis esineb tüvesid, mille bioloogiliste omaduste varieeruvus ületab erinevused nn. liikide keskmiste omaduste vahel. *Rhizobia* ainus selgepiiriline ja püsiv diferentseerimine seisneb tema tüvede jaotamises kiiresti ning aeglaselt kasvavateks. Liblikõieliste ristinokulatsioonirühmadega seotud mügarbaktereid on kõige õigem käsitleda ainult bioloogiliselt suhteliselt muutliku *Rhizobium*'i eri adaptatsioonivormidena.

ROOT NODULE BACTERIA ON LEGUMINOUS PLANTS GROWING IN THE ESTONIAN SSR

E. PÄRSIM

Summary

The symbiotic nitrogen-fixing bacteria on the roots of leguminous plants supply the greater part of the nitrogen nutrition of all plants.

It has been calculated by E. N. Mishoustin (1962) that leguminous plants in symbiosis with root nodule bacteria return to the soil about 3.5 million tons of nitrogen annually, while free-living nitrogen-fixing bacteria account for 1.5 million tons. Consequently the atmospheric nitrogen fixed by the root nodule bacteria in symbiosis with leguminous plants comprises about 60% of all the nitrogen in agricultural production. The theoretical basis of the given problem still needs a thorough study so as to increase the utilization of biological nitrogen in agriculture.

At the present level of development of microbiology of root nodule bacteria, a profound theoretical investigation of the problem is, according to A. A. Imshenetsky (1963) and E. N. Mishoustin (1965), most essential where the classification of the root nodule bacteria and investigation of the mechanism of nitrogen-fixing should come first, as well as the susceptibility of leguminous plants to inoculation with root nodule bacteria.

Our research work on the occurrence and properties of nodules and their bacteria was restricted, mainly, to cultural plants, wild plants receiving but little attention.

In Soviet scientific literature this problem has, so far, been dealt with casually (Petrosyan, 1959; Kalnynsh, 1962; Verner, Gordienko, 1967). In world literature, works by the following authors deserve mention: Fred, Baldwin, McCoy (1932), Allen, Baldwin (1954), Allen E., Allen O. (1959), and Rangaswami, Oblisami (1962). According to their data, 1300 species of leguminous plants (in 243 genera) were studied for the occurrence of nodules, 1112 species of which (in 213 genera) were found with nodules; no nodules were observed on the roots of 116 species, while

7 species remained unidentified. However, up to date, there are 13 000 known species of *Leguminosales* (in 550 genera), therefore the occurrence of nodules on the roots of 90 p. c. of leguminous plants has not been investigated at all so far.

For that reason it may safely be said that so far we are not familiar with all the varieties of root nodule bacteria. However, the elucidation of this problem would have a bearing not only on the theoretical side. It is highly possible that certain forms of root nodule bacteria, isolated from wild plants, could be profitably used in selection practice (Petrosyan, 1959). For the production of nitragen the most effective strain of nodular bacteria should be chosen. In the opinion of many investigators, local strains, as a rule, give the best results.

Nor has the taxonomic classification of root nodule bacteria, quite a complicated problem in itself, been completely resolved up to now.

Up to the present time the classification of the symbiotic bacteria species has been carried out on the basis of ecological criteria i. e. according to the ability of the bacteria to form nodules on different leguminous plants (Krasilnikov, 1949; Bergey, 1954), without due consideration to their morphological, physiological and biochemical properties. During the last few years, such investigators as Allen, Baldwin, (1954); Jensen, (1958), Manil, (1963), Graham, (1964) have declared that the determination of the symbiotic bacteria species by ecological criteria only has not justified itself and that the corresponding nomenclature should not be used. Otherwise it is impossible to include under *Rhizobia* those strains of symbiotic bacteria which are temporarily incapable of forming nodules, although they have all the morphological, biochemical and physiological properties, as, for example, is the case with avirulent strains of root nodule bacteria.

Root nodule bacteria can live not only on the roots of leguminous plants, but also freely in the soil. It is supposed that the symbiosis of root nodule bacteria with leguminous plants is not a specific property (Rippel-Baldes, 1952; Jakob, 1953).

Accordingly, it is of the utmost importance to obtain data as which of the leguminous plants have symbiotic bacteria, what are the biological, physiological and biochemical properties of the latters, and their capacity to nodulate on the roots of certain leguminous plants.

The present paper is one of the first attempts to solve these problems.

The chief aim of our researches was —

1) to study the occurrence of nodules on leguminous plants growing in the Estonian SSR, to describe their morphology and determine their dependence on soil conditions;

2) to study the *Rhizobia* cultures, and determine their morphological, cultural and chief biochemical properties;

3) to study the peculiarities of the chosen cultures of root nodule bacteria according to species of *Leguminosae* in regard to inoculation.

The Methods Used. In 1963 and 1964 expeditions to various districts of the Estonian SSR were carried out in summer to gather nodules from different wild leguminous plants. Not only the phenological properties of the plants from which nodules were taken, were determined, but also the number and properties of the nodules. Nodules were gathered from 690 plants belonging to 46 species (in 16 genera), from 10 to 60 specimens of each species, growing in 12 different soil types. Investigations were carried out while the leguminous plants were in bud and in blossom. Samples of soil from the rhizosphere were taken for the agrochemical determinations of soil reaction and of the content of easily soluble P_2O_5 and K_2O. Soil reaction in a KCl suspension was determined electrometrically with quinhydrone electrod; the P_2O_5 and K_2O content was tested by the Egner-Rim method in lactate buffer mixture.

The correlation method was used for determining the relation of the size and volume of the nodules to the height of the plant, also to the main properties of the soil, as for instance pH, the easily soluble oxides of potassium and phosphor (K_2O and P_2O_5) and their relationship. The degree of relationship between the quantities investigated was marked by means of correlation coefficients or part correlation coefficients; in some cases nonparametric sign criterion Z was used.

In order to determine the morphological, physiological and biochemical properties of the root nodule bacteria, 38 strains of bacteria were used, 33 of which had already been determined by the author (Pärsim, 1966). Five strains (from the nodules on the plants *Genista*, *Ornithopus*, *Trigonella*, *Lens* and *Soja*) were received from the Institute of Agricultural Microbiology (Leningrad) from N. M. Lazareva's collection. The strains whose species could not be identified by the determinants of Bergey and Krasilnikov, were named after the host-plants. Strains of *Rhizobium* were isolated from the nodules by Allen's method (Allen, 1953). The species of the isolated bacteria were determined by re-inoculation on the corresponding hosts.

A new kind of medium composed in the laboratory of microbiology of the Institute of Experimental Biology (Academy of Sciences of the Estonian SSR), containing 1000 ml distilled water, 0,5 gr K_2HPO_4, 0,2 gr $MgSO_4$, 0,1 gr NaCl, traces of $FeCl_3$, 30 ml yeast extract, 1,0 ml of M. B. Feodorov's microelement mixture, and 5,0 gr glucose served as the nutrient medium.

Some of the cultures, whose species were not identified, underwent parallel cultivations in two media containing glucose or tirozin. The cultures were kept for two weeks at 28° C. The purity of the strains from

Agrobacterium radiobacter and *A. tumefaciens* etc. was tested on a medium x_3 (Rahno, 1960) and MPA. The morphological properties of the isolated pure cultures were tested on the staple medium (SMNB) and in the same medium with Congo red and on bean agar. The size of the cells and the flagellae of the root nodule bacteria were examined under the phase-contrast system of a coloured microscope MBR-3 and an electronic microscope EM-7. When making preparations for the electronic microscope, the method was used as well as the drop dialysis method recommended by Kriss, Birusova and Zolkover (1948).

For determining the proteolytic and reduction properties of the isolated bacteria, SMNB with gelatine and litmus milk was used.

Carbohydrate fermentation capacity of the bacteria was investigated on galactose, arabinose, glucose, sucrose, lactose, maltose, inositol, sorbitol, dulcitol and mannitol. For that purpose, the carbohydrate under investigation was added to the nutrient medium, a concentration 0,05 M to 1 litre. Tests were made on solid medium (series I), as well as on liquid medium (series II).

In series I, where the dynamics of acid production during the fermentation of carbohydrates was studied, bromthymol blue indicator was added to the basic medium. In the course of eight weeks, the reaction changes of the medium were observed by the changes in colour and its intensity. After being infected with three-day pure cultures (fast-growing), the samples were incubated at 28° C.

In the course of the first two weeks observations were made every two days, after that every three and five days.

In the second series of tests the quantity of organic acids that accumulated after two-weeks fermentation was determined by potentiometer titration with NaOH. In each flack 1 ml of pure *Rhizobia* culture was sown. In oder to obtain an equal number of cells, a basic culture was grown and immediately before nodulation the titre of the bacteria was determined by means of nephelometer NFM and the Goryaev chamber.

Corresponding uninoculated variants of nutrient media in 3—4 replications served as controls.

For determining the specific infection capacity of root nodule bacteria, strains of the seeds of 11 species of leguminous plants, which were sterilized a minute and a half in concentrated H_2SO_4 or in one per cent solution of sublimate, were inoculated with 36 strains of root nodule bacteria. The sterility of the seeds was checked by the Rempe-Bernard method.

Broken stone (5—10 mm in diameter) or vermiculite (3—15 man granules) served as substratum. Before filling the test tubes (3.5—25 cm), in accordance with the schedule of the experiment, nutrients (Helrieghel's mixture No 2) with microelements were added. The system of

test-tubes was sterilized in an autoclave for an hour and a half at a pressure of 150 KN/m^2.

The growing seeds were bacterized with a suspension of titre 6×10^6 cells in 1 ml which was determined by an original nephelometric method.

The test-tubes with the plants were exposed to artifical light ("daylight" from white fluorescent tubes) for 8 to 12 weeks. After harvesting and drying the tops and the subterranean parts of the plants they were weighed separately; the number, size and colour of the nodules was determined as well.

When determining the quantity and weight of the nodules, inoculated leguminous plants of the same species as those from which the corresponding bacteria were separated from served as controls, and when the dried substance of the tops and roots were analysed, uninoculated plants were used as controls.

The data thus obtained were processed to statistical treatment with the application of dispersion analysis. For average indicators of the various totals in the fermentation of carbohydrates, Duncan's criteria were employed (Duncan, 1955).

The relationship between the dry substance content of the roots and the tops, as well as between the weight and the number of nodules was determined by means of correlation analysis and was expressed by the value of the correlation coefficient.

The Occurrence and Morphology of Nodules on the Roots of Leguminous Plants in the Estonian SSR and their Determining Factors. The species of leguminous plants investigated and the chief characteristics of the nodules found on their roots are given in Table 1. As can be seen from this table, all the species except *Astragalus glycyphyllus*, have nodules. But according to H. L. Jensen (1963) this species is known to have nodules, so evidently their absence on the 20 specimens from two districts of the Estonian SSR (Rakvere and Kingissepa) should be accounted for by the unfavourable soil conditions in these districts (pH KCl 5,0—5,7; P_2O_5 — 1,0—1,5 mg %; K_2O — 4—5 mg %).

Nodules occur on the tap root as well as on the lateral roots, forming a dense covering and having either a smooth or rough surface. The shape and size of the nodules vary depending on the species of the host plant and the properties of the soil.

The largest nodules (from 5 to 8 mm) are to be found on *Lathyrus odoratus, Lath. maritimus, Astragalus danicus, Vicia sylvatica, Vicia faba, Phaseolus vulgaris, Lupinus luteus* and *Lupinus polyphyllus*; the smallest nodules (from 0,5 to 1,5 mm) were found on *Lotus corniculatus* and on various species of *Trifolium*. For all the other species, the average diameter ranged between 2 mm and 4 mm.

The correlation analysis which we made in order to determine the relationship between the height of the plant and the size of its nodules (see Table 3) provides evidence for the fact that for the majority of species the correlative coefficient is statistically neglegible. But after calculating each particular correlative coefficient (eliminating the quantitative influence of nodules), it turned out that in the case of most species a reliable positive correlation exists between the size of the nodules and the height of the plant (e. g. *Lathyrus vernus, Lath. sylvestris, Trifolium arvense, Trif. repens, Vicia sylvatica, Vicia sativa, Ononis repens, Ononis arvensis, Lotus corniculatus, Anthyllis vulneraria* and *Medicago lupulina*). Considering the fact that the height of the plant, in its turn, is largely dependent on the nitrogen content, it follows from the statistical analysis that nitrogen fixation is greater where the nodules are bigger in size. But the greater height of a plant together with the amount of nitrogen fixation depends on the number of root nodules ($r = 0.7 \div 0.8$). These two indicators — the number of nodules and their size — are inverseley proportional; the fewer nodules there are, the greater they are in size for plants of the same height.

The shape of root nodules interested us in so far as it might serve as an auxiliary criterion for classifying root nodule bacteria. We were able to ascertain that the morphology of the nodules on the roots of leguminous plants varies considerably not only within one and the same genus, but also within a species. Accordingly, the root nodules of various species of *Trifolium* are spherical or rod-like in shape, while these of the species of *Vicia* are spherical, rod-like and palmate. The root nodules of plants of the genus *Tetragonolobus, Lotus, Oxytropis, Ononis, Anthyllis* are only spherical, while those of plants of the genus *Medicago* are only fingerlike.

The colour of root nodules depends on their age. At the beginning of development they are either white or pinkish or brown-reddish in colour, but as they grow they turn brown or brownish black.

In order to determine more fully the relation between the height of a plant and the properties of its root nodules, we also calculated the volume of the nodules in relation to their number and size. The analysis showed that the height of the plant in most cases is closely related to the volume of its root nodules. For ten out of eleven species examined the corresponding correlation coefficient was statistically reliable (see Table 3). Exception in this case was *Trifolium arvense,* for the height of these plants is very closely related to the number of root nodules, while their size and number are inversely proportional.

By comparing the basic properties of leguminous plants and their root nodules, also the agrochemical properties of the soil of their rhizosphere, we were able to draw some general conclusions. The number of nodules

on the roots of leguminous plants, also their size and volume depend, to a great extent, on the pH of the soil. In 18 cases out of 22, a greater concentration of hydrogen ions corresponded to a greater number and volume of root nodules, as, for example, in the case of *Vicia sylvatica*, where 9 nodules occurred at pH_{KCl} 4.6, while 22 were found at pH_{KCl} 7.0; in the case of *Lathyrus sylvestris* 5 were found at pH_{KCl} 5.5 and 13 at pH_{KCl} 7.0; in the case of *Lathyrus vernus* 3 were found at pH_{KCl} 5.7, and 16 at pH_{KCl} 6.9; in the case of *Lotus corniculatus* 4 were found at pH_{KCl} 4.7, and 12 at pH_{KCl} 7.0, etc. In similar manner a larger content of easily soluble K_2O and P_2O_5 corresponded to a larger number of root nodules. At the same time, however, the relationship of K_2O/P_2O_5 was apt to hinder their growth. In 15 cases out of 22 a higher ratio for K_2O/P_2O_5 corresponded to a smaller number and size of the nodules. The most favourable K_2O/P_2O_5 ratio for leguminous plants is considered to be 1 : 1.72 (Geltser, 1948).

Analyses have shown that in Estonia, as a rule, considerable deviations occur from the ideal ratio for potassium and phosphor.

The growth of leguminous plants is also in close correlation with the pH of the soil, nearly as much as is the number and size of the nodules. This is particularly evident in the case of *Lathyrus sylvestris* (pH_{KCl} 5.7 and 7.0 corresponding to 37 cm and 73 cm respectively in height of the plants); in the case of *Vicia sylvatica* the corresponding figures are pH_{KCl} 4.6 and 7.2 tallied with the height of 48 cm and 76 cm; and for *Vicia sativa* the figures are pH_{KCl} 5.1 and 7.0 with a height of 58 cm and 69 cm respectively. In two cases (*Trifolium arvense* and *Medicago lupulina*) the increase of soil reaction had no effect on the height of the plant.

Leguminous plants can be subdivided into two groups in respect to soil reaction. The first group comprises the species on which nodulation occurs within a wide interval of soil pH: *Lotus corniculatus* (pH_{KCl} 4.7—7.0), *Vicia sylvatica* (pH_{KCl} 4.6—7.1), *Vicia sativa* (pH_{KCl} 5.1—7.0), *Lathyrus vernus* (pH_{KCl} 5.7—6.9), *Lathyrus sylvestris* (pH_{KCl} 5.8—7.0), *Trifolium repens* (pH_{KCl} 5.9—7.0) and *Trifolium arvense* (pH_{KCl} 6.0—7.0). To the other group belong those species on which symbiosis with nodule bacteria occurs within a narrow interval of soil pH: *Ononis repens* (pH_{KCl} 6.8—7.2), *Ononis arvensis* (pH_{KCl} 6.8—7.3), *Anthyllis vulneraria* (pH_{KCl} 7.0—7.4) and *Medicago lupulina* (pH_{KCl} 6.9—7.3).

Consequently, the most sensitive to soil pH are the nodule bacteria living on the species *Medicago, Ononis* and *Anthyllis,* and those with the highest resistence are the symbiotic nitrogen-fixing bacteria living on the species *Vicia, Trifolium, Lathyrus* and *Lotus.*

The analysis of soil samples have shown that the majority of legumin-

ous plants found in the Estonian SSR grow on sod carbonatic and soddy-gley soils.

Our studies have also confirmed that in order to increase the effectiveness of symbiosis of plants with nodule bacteria, it is necessary to take into account the whole complex of environmental factors.

The Morphological, Physiological and Biochemical Properties of Nodule Bacteria. For the initial checking of the purity of bacteria cultures isolated from the nodules of leguminous plants, we studied the growth of these bacteria on two media — x_3 (Rahno, 1960) and meatpepton agar (MPA), since it is known (Allen O, Allen E., 1950) that *Rhizobium* (except *Rh. meliloti*) does not grow at all, or grows very badly, on medium MPA, while *Agrobacterium radiobacter* grows extraordinarily well on it.

Tests showed that 11 out of the 38 strains investigated had the capacity to grow and form colonies on medium MPA. Six of these strains belong to *Rh. meliloti*. On the 4th or 5th day of incubation they all produced large light grey slimy colonies, from 2 to 4 cm in diameter. Two out of the remaining five strains belong to *Rh. leguminosarum*, one to *Rh. trifolii*, and two strains were separated from the nodules of *Astragalus danicus* and *Ononis repens*, whose species are not given in any of the available guide books. The strains that were isolated from the nodules on the roots of *Vicia sylvatica, Lathyrus sylvestris* and *Trifolium hybridum*, and grown on the medium MPA, formed small round half transparent light grey colonies only when the plants had grown in soil with an alkaline reaction (pH $>$ 7.0). If all the bacteria were isolated from *Vicia sylvatica* and *Lathyrus sylvestris*, which had grown on acid soil (pH from 4 to 6), they lacked the ability to form colonies on those media.

The strains isolated from *Ononis repens* formed slimy half transparent light-grey colonies. The same can be said about strains isolated from *Astragalus danicus*, only in this case the growth was not so intense. Generally speaking these two strains grown on the medium MPA had much in common with the strains of *Rh. meliloti*, only the size of the colonies of the former was smaller.

The staining of cultures by Gram's method showed that all the strains studied by us were gram-negative. All nodule bacteria are rod-like and stain evenly. In oder to study the cycle of development of nodule bacteria we carried out analogous investigations with one-, two- and four-day cultures and ascertained that cultures of different age differed considerably in their morphological character. For intance, 24 hours old cultures contained only mobile rods with homogenous protoplasm; while vacuolated immobile rods prevailed in 48 hours old cultures, although some evenly stained homogeneous cells also occurred. This is the beginning of the change in their development into "real" rod-like bacteria.

Four-days old nodule bacteria cultures contained only vacuolated and granulated rods, which had completely lost mobility. Some small coccoide forms occurred. The development of the whole culture had reached the stage of "real" cells. The previous description of the changes that nodule bacteria cultures undergo in the life cycle coincides with those given in earlier works, which describe the pleomorphism of *Rhizobia* in their life cycle (Thornton, Gangulee, 1962; Lewis, 1938; Bisset, 1952; Stapp, Knösel, 1956). Twenty-four hour cultures being the most suitable, we used them for the electron-microscopic studies of bacteria cells.

The biggest cells were found in the cultures of nodule bacteria isolated from *Lathyrus, Vicia, Trifolium, Medicago, Melilotus* and *Onobrychis*. They were from 2.5 to 3.5 μ in length and form 0.7 to 0.9 μ in diameter. Next in size (length — from 1.5 to 2.5 μ, diameter — from 0.5 to 0.8 μ) were the bacteria isolated from *Phaseolus vulgaris, Ononis repens, Astragalus danicus, Oxytropis pilosa, Ornithopus sativus, Lupinus luteus, Genista* and *Soja*. The smallest nodule bacteria were those isolated from *Lotus corniculatus, Anthyllis vulneraria* and *Tetragonolobus siliquosus* (length from 1.0 to 1.5 μ and diameter from 0.3 to 0.6μ).

Nodule bacteria fall into two groups by the quality and distribution of their flagellae. For *Ornithopus sativus, Lupinus luteus, Genista* and *Soja* the bacteria are monotrichous, i. e. they have one flagellum attached to the end of the rod. The nodule bacteria of all the other leguminous plants are peritrichous. It is interesting to note that monotrichous bacteria happen to be the slow-growing ones.

The cultural and physiological properties of the isolated strains of bacteria were studied on the stample medium of nodule bacteria (SMNB), SMNB with Congo red and bean agar. We also determined the beginning of colony formation and the tempo of growth, as well as the form, size and colour of the colonies. Subsequently we were able to divide all the strains grown on these media into two groups — the fast-growing and slow-growing strains. To the latter belong the strains isolated from the nodules of *Ornithopus sativus, Lupinus luteus, Soja* and *Genista*. Their colonies began to form only on the 8th or 10th day. All the other strains were the fast-growing ones, which formed colonies in 3 to 5 days. The colonies of these two groups also differ in their properties, as, for example, almost all the fast-growing colonies without exception formed round (diameter from 4 to 10 mm) colonies, half transparent, slimy, light grey in colour, while all the colonies of the slow-growing strains were small (diameter from 1.5 to 2.0 mm), very dense and sticky, with a milky white opalescent surface. The differences between the various strains within these basic groups are but slight.

The rate of growth also depends on the nutrient media used. On

medium SMNB with Congo red the formation of nodule bacteria colonies begins sooner and the colonies are bigger than when bean agar was used.

When nodule bacteria were cultivated on litmus milk certain differences between the slow and fast-growing bacteria were observed, so, for example, all the slow-growing strains give an alkaline reaction, but do not have a serum zone, while the fast-growing strains give either an acid reaction of the media or an alkaline reaction with a serum zone. On the other hand, three types of reaction were observed among the fast-growing strains: 1) alkaline reaction with the serum zone — *Rh. leguminosarum, Rh. trifolii, Rh. phaseoli* and strains from *Lotus corniculatus, Anthyllis vulneraria, Tetragonolobus siliquosus, Astragalus danicus, Oxytropis pilosa*; 2) acid reaction with the serum zone — *Rh. meliloti* and strains from *Ononis repens* and 3) acid reaction without the serum zone — strains from *Onobrychis viciifolia.*

While cultivating on gelatine four types of growth (by the form of the crater) and rarefication were observed, which, however, correlates unsatisfactorily with the species of bacteria. For instance, some strains of *Rh. leguminosarum* (from *Vicia sylvatica, V. cracca, Lathyrus sylvestris, Pisum sativa, Lathyrus niger, L. pisiformis, L. vernus*) and strains from *Astragalus danicus* and *Oxytropis pilosa* formed craters shaped like an inverted fir-tree, while other strains of *Rh. leguminosarum* (from *Vicia sativa, V. sepium, V. faba, V. cassubica, Lathyrus palustre, Lens culinaris*) formed craters like a twisted tape. The same form has been observed in the case of some strains of *Rh. trifolii (Trif. arvense, Trif. alpestre, Trif. pratense, Trif. medium, Trif. fragiferum*) and in the case of *Trigonella.* The rest of the strains of *Rh. trifolii* make threadlike craters which are wider at the top and grow narrower towards the bottom of the test tube.

All the slow-growing strains have a well-developed dense white mass in the upper part of the test-tube. The crater narrows suddenly to a sharp point like a funnel.

Gelatine is liquified by the strains from *Melilotus, Medicago, Phaseolus vulgaris, Ononis repens, Lotus corniculatus, Anthyllis vulneraria* and *Tetragonolobus siliquosus.* The three last mentioned strains rarefy the media only on the upper surface, while the others affect the whole media.

There is also a great difference between the slow and fast-growing strains in their ability and manner of decomposing various carbohydrates with a resulting acid or alkaline reaction (See fig. 12; 13 a, b). All the fast-growing strains change the reaction of the media to an acid one. During incubation the acid reaction increases. The rate of increase of acidity is maximal at the beginning of incubation then the rate decreases gradually, but acidity continues to increase to the very end of the incubation period, i. e. for three months. The intensity of acid formation and its dynamics depend on the carbohydrate used in the media. The largest

amount of acid was observed in the fermentation of galactose, arabinose and glucose, considerably less of it was found in the case of inositol, sorbitol, dulcitol and maltose.

When the latter carbohydrates were used, the rate of acidity increase differed to some extent from the fermentation of the first group. In this case, at the beginning of incubation, increase of acidity was considerably less than that of the first case; towards the end of the observation period, the rate of acidification was higher. Media with sucrose and glucose occupied a place between the two extremes for the rate of acidity increase as well as for its absolute value.

All the slow-growing strains produced an alkaline reaction of the media at the beginning of incubation, and it went on increasing during the first two weeks (see fig. 13 a), the increase depending on the carbohydrate was used, and also on the strain, but to a less degree. On reaching a certain stage the alkaline reaction decreased and began to turn acid. When galactose and arabinose were used the media reaction passed through the neutral zone at the end of the first week of incubation, while in the case of glucose, the reaction turned acid in three weeks. After that the acidity of the media increased rather fast in the course of three months. Where the other carbohydrates were used, the media reaction remained alkaline even after three months. The media containing maltose had a high alkaline reaction, which kept on increasing almost to the end of the observation period. In the case of sucrose, lactose, sorbitol and dulcitol the alkaline reaction was found at its maximum after two weeks of incubation.

In a special series of tests we determined the quantity of acids produced as a result of fermenting 9 carbohydrates in the course of 2 weeks by titrating them with NaOH.

The dispersion analysis showed that statistically significant differences in acid production were found not only between the species of nodule bacteria, but also between individual strains and between the various carbohydrates and their groups.

When the statistically significant differences were analysed by means of Duncan's criteria, we were able to determine that by the average ability to produce acid with the fermentation of 9 carbohydrates, all the strains we worked with could be divided into 3 groups (see fig. 13 a, b): 1. the strains which turned the media alkaline during the fermentation of carbohydrates; 2. the strains with a moderate capacity of acid production (15—45 μg-ekv per 10^6 inoculated cells). 26 strains of 4 species of *Rhizobia* belong to this group; 3. intensive production of acid (60—75 μg-ekv per 10^6 cells). Eight strains of 3 species of *Rhizobia* belong to this grup. It is interesting to note, by the way, that 6 of the 8 intensive acid producers were the strains isolated from leguminous plants which grew in rather alkaline soil on the island of Saaremaa. This confirms Norris hypothesis

(1965) that the production of acid is connected with the host plants adapting itself to alkaline soils. The differences between the strains within these groups were considerably small.

It should also be noted that no strict relationship between the ability to produce acid and the species of the plant was found. Some of strains deriving from one and the same species belong to the group of moderate acid producers, while others are intensive acid producers, which is evident from the average values of 9 carbohydrates.

On assessing the significance of the differences between the various species, we have ascertained that on the basis of the average indicators the species *Rh. phaseoli, Rh. trifolii, Rh. leguminosarum,* also *Rh. simplex* do not differ and they form one group. Considerably less acid is produced by the strains of *Rh. meliloti* and the strains isolated from *Ononis repens, Tetragonolobus siliquosus, Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria.* On the other hand, the strains isolated from *Oxytropis pilosa* and *Astragalus danicus* produce a lot more acid than the strains from the species *Rh. phaseoli, Rh. trifolii, Rh. leguminosarum* or *Rh. simplex.* The species *Rh. lupini* and *Rh. japonicum* are distinct from the others: as a rule, they turn the media alkaline during the fermentation of carbohydrates, but among themselves they do not differ (see tab. 15).

Although the classification of nodule bacteria on the basis of cross-inoculation groups does not fully correspond to their grouping according to their biochemical (fermentative) properties, still there is a definite correlation between their belonging to one or another of the groups in respect to their ability to produce acid during the fermentation of carbohydrates and to the tribes of the host plant (see tab. 16).

The ability of one or other of the strains of nodule bacteria to produce acid or alkali depends on the carbohydrate used in each case, while the grouping of the various strains of *Rhizobium* remains fundamentally the same.

When analysing the distinctions between the individual carbohydrates and their types according to their effectiveness in acid prodiction during the fermentation of nodule bacteria, we distinguished three groups (according to the ebbing of effectiveness): 1) arabinose, galactose, glucose, sucrose and mannitol; 2) lactose; 3) maltose, sorbitol, inositol.

The Symbiotic Properties of Nodule Bacteria. The symbiosis of nodule bacteria with leguminous plants is of great practical importance not only for agriculture, as a means for raising crop productivity and for increasing the amount of nitrogen fertilizer in soil, but it also happens to be one of the most interesting and mysterious phenomenon in biology, the basic theoretical aspects of which have not yet been solved in spite of intensive research.

The present paper treats our investigations in the symbiotic properties

of 36 strains of nodule bacteria with which 11 species of leguminous plants were inoculated in the sterile laboratory environment. In the main, we concentrated on determining the virulence of various strains of nodule bacteria according to their nodule forming capacity, i. e. their capacity to live symbiotically with various leguminous plants, and also on the efectiveness of these symbiotic partners according to the relative increase of the dry weight (in percentage) of the plant in symbiosis as compared with uninoculated control plants.

Of the 303 leguminous plants inoculated with nodule bacteria, the formation of root nodules (i. e. symbiosis) occurred in 128 cases (see fig. 21). By increasing the dry weight of the plant as compared with the uninoculated controls we studied the effectiveness of these partners and found that two types of symbiosis exist — one having an effectiveness of about 100 per cent (the so-called effective symbioses) and the other with 0 per cent, i. e. the so-called ineffective symbiosis (see fig. 24). An effectiveness of 50 p. c. or thereabouts did not occur. These two extremes in the scale of distribution were also confirmed statistically with a high degree of reliability. In the case of ineffective symbiosis the number of nodules is considerably little, also their total weight is much less. Effective symbiosis was always found to occur when the plants were inoculated with bacteria from the nodules of the same species of plant from which they had been isolated, or from the nodules of other species which belonged to the same cross-inoculation group.

It is interesting to note that in all the 27 combinations of cross-inoculation of plants from the bird's-foot trefoil group *(Lotus corniculatus, Anthyllis vulneraria* and *Tetragonolobus siliquosus)* by the strains of nodule bacteria from the group *Rh. leguminosarum* and vice versa, the formation of nodules was found. Moreever, in 23 cases their symbiosis was effective (see fig. 21).

The data given above demonstrate that the bird's foot trefoil and *Rh. leguminosarum* host plants form a common cross-inoculation group.

The strains from *Ononis repens* entered into effective symbiosis with *Melilotus albus* and also resulted in nodules on *Medicago sativa.* Consequently, *Ononis repens* forms a common cross-inoculation group with these species.

Inoculation with *Astragalus danicus* strains also resulted in effective symbiosis when they were isolated from *Oxytropis pilosa* and *Caragana arborescens*, but the strains isolated from *Astragalus danicus* did not give nodules on *Caragana arborescens.* The strains isolated from *Caragana arborescens,* however, formed nodules on *Vicia sepium* and *Vicia cracca* and gave effective symbiosis with *Lathyrus pratensis.* The final solution of the problem of their appertaining has not yet been reached.

Our tests showed that a considerable number of *Rhizobium* strains can

nodulate on the roots of leguminous plants from other cross-inoculation groups, but, as a rule, their symbiosis is quite or almost ineffective. For instance, in the case of *Medicago sativa* and *Melilotus albus*, not only the strains of *Rh. meliloti* nodulate, but also those of *Rh. trifolii, Rh. leguminosarum, Rh. lupini, Rh. simplex,* and the strains of *Astragalus danicus, Caragana arborescens, Lotus corniculatus, Onobrychis viciifolia* and so on as well (see fig. 21).

Consequently, it is very difficult to test the cross-inoculation groups only on the one fact of nodule formation. A more accurate grouping can be made on the basis of symbiotic effectiveness.

In our experiments, the effectiveness of various symbiotic combinations was studied not only in respect to the increase in the rate of growth of the dry substance as the chief criterion of effectiveness, but also in respect to other criteria, such as 1) the quantity of the nodules, 2) the total weight of the nodules, 3) the weight of the dried roots. The statistical analysis of the respective data showed that all these factors are correlative. The closest relationship was found to exist between the weight of the dried tops of the plant and total weight of the nodules on the roots ($r = 0.696$). The correlative coefficient of the weight of the dried roots to the number of nodules is $r = 0.589$, which is reliable.

Conclusions.

1. Data concerning the nodules found on the 46 species of leguminous plants belonging to 16 genera (a total of 690 plants), that grow in the Estonian SSR:

a) nodules are distributed over the whole root system, but most of them occur on the lateral roots;

b) the nodules are distinguishable by their size and shape. These distinctions depend on the plant (its species and genus), also on the properties of the soil (its type, pH, the content of easily soluble phosphor and potassium etc.);

c) the colour of the nodules depends on their age. When they begin to develop they are white, pink or reddish brown, and in course of development they become brown or brownish black.

2. The various strains isolated from the root nodules of leguminous plants differ very little in respect to their average morphological character. Their general similarity does not allow classification according to species, but only according to their host plants:

a) all the nodule bacteria studied turned out to be gram-negative;

b) the size of the bacteria ranges from 1 to 3.5 μ in length and from 0.3 to 0.9 μ in diameter depending on the host plant;

c) in respect to the rate of forming colonies on artifical media, the

strains we studied fall into two main groups, namely slow-growing and fast-growing. The slow-growing strains were those that were isolated from the root nodules of *Ornithopus sativus, Lupinus luteus, Soja* and *Genista.* All the other strains that were under investigation are fast-growing;

d) all the cells of the slow-growing strains were monotrichic with one subpolar flagellum. When cultivated in litmus milk they had an alkaline reaction, but no serum zone was formed. Neither were they able to liquify gelatine.

The flagellae of fast-growing strains are distributed over the whole surface of the cell being peritrichic. When the bacteria are grown in litmus milk they produce either an acid or an alkaline reaction with a serum zone. The strains isolated from *Melilotus, Medicago, Phaseolus vulgaris, Ononis repens, Lotus corniculatus, Anthyllis vulneraria* and *Tetragonolobus siliquosus* are all able to liquify gelatine. In the case of the last three mentioned strains, only the upper part of the media was slightly liquified, after 4 weeks of incubation. In the case of the other strains, the whole media was liquified;

e) all the strains of *Rhizobium* were capable of decomposing all the carbohydrates that were used for experiments (arabinose, galactose, glucose, mannitol, sucrose, lactose, maltose, sorbitol, inositol and dulcitol). The fermentation of the carbohydrates in the media brought about an acid or an alkaline reaction. All the strains of *Rhizobium* can be divided into two groups in respect to the media reaction during fermentation and the rate of the changes: 1) the strains that have an acid reaction in fermentation (all the fast-growing strains); 2) the strains that during the fermentation of carbohydrates at the beginning of incubation had an alkaline reaction, which later, increased or remained the same, depending on the carbohydrate, and then turned into acid reaction (all the slow-growing strains).

The fast-growing strains can be subdivided into two groups in respect to their acid producing intensity during fermentation, namely 1. the moderate group, which produced during 2 weeks of incubation at 20° C an average of 14—15 μg-ekv acid per 10^6 cells, and 2) those with a high intensity, which produced from 60 to 75 μg-ekv acid per 10^6 cells under the same conditions. Twenty-six of the strains we investigated had a moderate intensity, while 8 strains had a high intensity.

f) the amount of acid produced during fermentation depends on the kind of carbohydrate used. Arabinose, galactose, sucrose and mannitol produced the most acid when they were decomposed during fermentation, while maltose, sorbitol and inositol produced much less. Lactose occupies a middle place between these two groups.

3. The acid producing ability of nodule bacteria also depends on the "tribe" of the host-plant, namely, the strains isolated from the plants of a certain tribe almost without exception belong to one and the same group in respect to their acid producing ability.

4. The growth of a leguminous plant depends on the quantity and weight of its nodules, while the number of nodules in its turn correlates with pH of the soil and its phosphor and potassium content.

The weight of the dried plant and its roots is correlative — with the quantity and weight of its nodules. It depends more on the total weight of the nodules than on their number.

5. In respect to the pH of the soil, the nodule bacteria we investigated can be subdivided into two groups: 1) those which will grow within a wide range of pH (4.6 to 7.1), which include the strains from *Vicia, Lathyrus, Trifolium* and *Lotus*; 2) those which will grow within a narrow range of pH (6.8 to 7.4) which include the strains isolated from *Medicago, Ononis* and *Anthyllis*.

6. In the cross-inoculation tests two types of symbiosis was found to exist between the root nodule bacteria and their host plants the leguminosae. In the case of effective symbiosis, the growth of the plant (reckoned by the weight of the dry substance) is on the average twice as fast, as in the case of un-inoculated plants. In the case of in-effective symbiosis there is no reliable increase in the rate of growth of the plant.

If a plant is inoculated with nodule bacteria isolated from a plant of the same species, it always results in effective symbiosis. If a plant is inoculated with strains isolated from a plant of another species, nodules are formed on the roots in many cases, but their symbiosis is ineffective. Effective symbiosis occurs, as a rule, when the inoculated plant belongs to the same cross-inoculation group as the plant from which the given strain was isolated.

7. The grouping of nodule bacteria according to their biochemical and infectional properties does not correspond to the existing classification of the genus *Rhizobia* into species:

a) during the fermentation of carbohydrates, some strains of one species may have only a moderate acid producing ability, while other strains of the same species may be highly intensive in this respect. For that reason there is no reliable distinction in the average acid producing ability between the species of *Rh. phaseoli, Rh. trifolii* and *Rh. leguminosarum*. They form one group (acid producing 40 μg-ekv). Less acid is produced by *Rh. meliloti,* which together with the strains of *Ononis, Tetragonolobus, Lotus* and *Anthyllis* form the second group (acid producing 20 μg-ekv). The third and last group comprises the highly intensive strains which were isolated from *Astragalus* and *Oxytropis* (acid

producing 70 μg-ekv). The strains isolated from *Onobrychis viciifolia* occupy a middle place between the last two groups;

b) leguminous plants from the bird's-foot trefoil group *(Lotus corniculatus, Anthyllis vulneraria* and *Tetragonolobus siliquosus)* from a common cross-inoculation group with *Rh. leguminosarum.* Consequently, the strains isolated from these plants belong to the species *Rh. leguminosarum*;

c) strains isolated from *Ononis repens* belong to the species *Rh. meliloti,* while the plant itself together with *Medicago sativa* and *Melilotus albus* belong to one and the same cross-inoculation group.

d) *Oxytropis pilosa* and *Astragalus danicus* belong to one and the same cross-inoculation group, while the nodule bacteria which feed their roots cannot be included into any existing species of *Rhizobia.* They form a separate group as to their biochemical as well as their infectional properties.

8. The data obtained in this work illustrate the fact that the existing taxonomic classification of *Rhizobium* based on the cross-inoculation groups of their host plants does not correspond to the morphological, physiological and biochemical differentiation of root nodule bacteria, nor to their ability to nodulate. The variations of the biological properties and character of the strains within one and the same species are greater than the variations of the average properties of the species. The only clear and constant differentiation of *Rhizobium* strains is their subdivision into fast- and slow-growing varieties. Nodule bacteria regarded from the point of view of cross-inoculation groups are most likely to be only the various adapted forms of the biologically mutable *Rhizobium.*

КЛУБЕНЬКОВЫЕ БАКТЕРИИ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ В ЭСТОНСКОЙ ССР

Э. ПЯРСИМ

Резюме

Клубеньковые бактерии в симбиозе с бобовыми растениями обеспечивают большую часть потребности в азотном питании всего растительного мира. По подсчетам Е. Н. Мишустина (1962) в СССР бобовые растения в симбиозе с клубеньковыми бактериями возвращают в почву ежегодно около 3,5 мил. т азота, а свободноживущие азотфиксаторы — 1,5 мил. т. Таким образом азот, связанный в результате симбиоза бобовых растений и клубеньковых бактерий, составляет около 60% от всего азота, находящегося в сельскохозяйственной продукции.

Для того, чтобы использование биологического азота в сельском хозяйстве получило в дальнейшем еще большее применение, необходимы прежде всего основательное изучение и разработка теоретических основ данной проблемы.

А. А. Имшенецкий (1963) и Е. Н. Мишустин (1965) считают, что на современном этапе развития микробиологии клубеньковых бактерий наиболее существенным является углубление теоретических исследований, в первую очередь по вопросам систематики клубеньковых бактерий, выяснению механизма азотфиксации, а также по изучению восприимчивости бобовых растений к инфекции клубеньковыми бактериями.

При изучении распространения клубеньков и клубеньковых бактерий исследователи ограничивались в основном культурными растениями. Значительно меньше внимания обращали на распространение и свойства клубеньковых бактерий и дикорастущих растений.

В отечественной научной литературе этот вопрос был затронут только попутно (Петросян, 1959; Калниньш и др., 1962; Вернер, Гордиенко, 1967). В мировой литературе по этому вопросу следует упомянуть труды Фреда, Болдуина и Мак-Коя (Fred, Baldwin, McCoy, 1932), Ал-

лена и Болдуина (Allen ja Baldwin, 1954), Аллена Е. и Аллена О. (Allen, E., Allen, O., 1961) и Рангасвами и Облисами (Rangaswami, Oblisami, 1962). По их данным, распространение клубеньков изучено приблизительно у 1300 видов бобовых, относящихся к 243 родам, из которых у 1112 видов (213 родов) клубеньки обнаружены, у 166 их не оказалось, а у 7 видов наличие клубеньков осталось сомнительным. В настоящее время считают, что отряд *Leguminosales* охватывает около 13 000 видов (550 родов), следовательно, наличие клубеньков у 90% бобовых растений осталось все же неизученным.

Поэтому придется, по-видимому, согласиться с утверждением о том, что нам известны далеко не все представители клубеньковых бактерий. Однако внесение ясности в этот вопрос представило бы значительный интерес не только с теоретической стороны. Возможно, что некоторые формы клубеньковых бактерий, изолированные от дикорастущих растений, с успехом можно использовать в практической селекционной работе (Петросян, 1959). Для производства нитрагина следует выбрать самые эффективные штаммы клубеньковых бактерий. По данным многих исследователей, именно местные штаммы, как правило, являются самыми эффективными.

Довольно сложным и до сих пор окончательно нерешенным является вопрос таксономической классификации клубеньковых бактерий.

До настоящего времени при видовой классификации клубеньковых бактерий за основу принимают экологический критерий — способность бактерий образовывать клубеньки у тех или других бобовых растений (Красильников, 1949; Bergey, 1954), не обращая при этом должного внимания на их морфологические, физиологические и биохимические свойства. В последние годы многие исследователи (Allen, Baldwin, 1954; Jensen, 1958; Smith, 1958; Manil, 1963; Graham, 1964) высказали мнение, что определение видов клубеньковых бактерий только по экологических критериям не оправдано и что в дальнейшем не следует использовать соответствующую номенклатуру. В противном случае нельзя будет включать в *Rhizobia* те штаммы клубеньковых бактерий, которые временно не способны образовывать клубеньки, хотя и имеют все их морфологические, биохимические и физиологические признаки. Такими могут быть авирулентные штаммы клубеньковых бактерий.

Клубеньковые бактерии обитают не только на корнях бобовых растений, но и могут свободно жить в почве. Существует также мнение, что симбиоз клубеньковых бактерий с бобовыми является неспецифическим свойством (Rippel—Baldes, 1952; Jakob, 1953).

Следовательно, большое значение имеет получение данных о том, у каких бобовых растений имеются клубеньковые бактерии, каковы их биологические, физиологические и биохимические свойства, а также выяснение их способности инфицировать определенные бобовые растения.

Настоящая работа является одной из первых попыток, предпринятых для выяснения этой задачи.

Основная цель наших исследований заключалась в следующем:

1) изучить распространение клубеньков у бобовых растений, растущих в Эстонской ССР, описать их морфологию и определить ее зависимость от почвенных условий;

2) выделить из изученных клубеньков культуры *Rhizobia* и определить их морфологические, культуральные и основные биохимические свойства;

3) выяснить специфичность выделенных культур клубеньковых бактерий по их способности инфицировать соответствующие виды бобовых растений.

Методика. Летом 1963 и 1964 гг. были организованы экспедиции в районы ЭССР для сбора клубеньков от различных дикорастущих бобовых растений. При этом были установлены не только фенологические свойства растений, от которых брали клубеньки, но и численность и свойства взятых клубеньков. Клубеньки были собраны на 12 почвенных разностях с 690 растений, представляющих 46 видов (16 родов) бобовых растений, по 10—60 растений от каждого изучаемого вида. Исследования проводились в периоды бутонизации и цветения бобовых. Из ризосферы растений брали почвенные пробы для агрохимического определения реакций почвы и содержания в ней легкорастворимых P_2O_5 и K_2O. Реакцию почвы определяли в солевой суспензии электрометрически с хингидронным электродом; содержание P_2O_5 и K_2O — в лактатбуферной смеси по методу Эгнера—Рима.

Для определения связи между количеством, размером и объемом клубеньков и высотой растений, а также основными свойствами почвы, такими как pH, содержание легкорастворимых окиси калия и фосфора и их соотношение (K_2O/P_2O_5), применяли методы корреляционного анализа. Степень связи между изучаемыми величинами выражали с помощью коэффициентов корреляции или частных коэффициентов корреляции при исключении остальных параметров. В некоторых случаях применяли непараметрический критерий знаков *.

Для определения морфологических, физиологических и биохимических свойств клубеньковых бактерий было использовано 38 штаммов бактерий, 33 из которых были выделены автором (Пярсим, 1966). 5 штаммов (из клубеньков растений *Genista*, *Ornithopus*, *Trigonella*, *Lens* и *Soja*) были получены из ВНИИСХМ из коллекции Н. М. Лазаревой. Штаммы, видовую принадлежность которых нельзя было установить по определителям Берджи и Красильникова, получили наименование по растению-хозяину. Штаммы *Rhizobium* были изолированы у клубеньков по методу Аллена (Allen, 1953). Видовая принадлежность

выделенных бактерий была проверена реинокуляцией на соответствующие растения-хозяева.

В качестве основной питательной среды была использована оригинальная среда, выработанная в лаборатории ИЭБ АН ЭССР, следующего состава: дистиллированная вода — 1000 мл, K_2HPO_4 — 0,5 г, $MgSO_4$ — 0,2 г, NaCl — 0,1 г, $FeCl_3$ — следы, дрожжевой экстракт — 30 мл, смесь микроэлементов по М. В. Федорову — 1,0 мл, глюкоза — 5,0 г.

Часть культур, видовая принадлежность которых не была установлена, культивировалась параллельно на двух основных средах с глюкозой или тирозином. Чашки с культурными выдерживались при 28° С в течение двух недель. Чистота выделенных штаммов от *Agrobacterium radiobacter* и *A. tumefaciens* и т. д. проверялась на среде x_3 (Рахно, 1960) и МПА. Морфологические свойства выделенных чистых культур проверялись на основной среде (ОКБ) и той же среде с Конго красным и на бобовом отвар-агаре. Величины клеток и жгутиков клубеньковых бактерий исследовали с помощью фазово-контрастной системы светового микроскопа МБР-3 и электронного микроскопа ЭМ-7. При изготовлении препаратов для электронного микроскопа наряду с рекомендованным Криссом, Бирюзовой и Золковером (1948) методом капельного диализа использовали и метод теневых покрытий.

Для определения протеолитического и редуционного свойств выделенных бактерий использовали ОКБ с желатином и лакмусовое молоко.

Способность ферментировать углеводы изучалась на галактозу, арабинозу, глюкозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, инозит, сорбит, дульцит и маннит. Для этого изучаемый углевод вводили в питательную среду в концентрации 0,05 моля на 1 литр. Опыты проводились как на твердой (I серия), так и на жидкой среде (II серия).

В первой серии, в которой изучалась динамика кислотообразования при ферментации углеводов, к основной питательной среде добавляли бром-тимоловый синий. В течение восьми недель по изменению цвета и его интенсивности следили за изменением реакции среды. После заражения чистыми трехдневными (быстрорастущими) и пятидневными (медленнорастущими) культурами пробы инкубировали при 28° С. Наблюдения в течение первых двух недель проводили через каждые два дня, а затем — через три и пять дней.

Во второй серии опытов потенциометрическим титрованием с NaOH определяли количество органических кислот, образовавшихся в течение двухнедельной ферментации. В каждую колбу высевали по 1 мл чистой культуры *Rhizobia*. Для получения равномерного количества клеток выращивали маточную культуру и непосредственно перед инфицированием определяли в ней титр бактерий с помощью нефелометра НФМ и камеры Горяева.

В качестве контроля во всех вариантах использовали соответствующие неинфицированные варианты питательных сред в трех и четырех повторностях.

Для установления специфической инфекционной способности штаммов клубеньковых бактерий семена II видов бобовых растений, стерилизованные в концентрированной H_2SO_4 или 0,1%-ном растворе сулемы в течение полутора минут, инфицировали 36 штаммами клубеньковых бактерий. Стерильность семян проверяли по методу Ремпе—Бернарда. В качестве субстрата использовали щебень (5—10 мм сечения) или вермикулит (3—15 мм сечения). Перед набивкой в каждую пробирку (3,5 × 25 см) согласно схеме опыта вносили питательные элементы по смеси Гельригеля № 2 с добавлением микроэлементов. Систему пробирок стерилизовали в автоклаве в течение полутора часов при давлении 150 кн/м^2.

Проращиваемые семена бактеризовали суспензией титром $6 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл, который был определен оригинальным нефелометрическим методом.

Пробирки с растениями выдерживали при искусственном освещении (дневном светом) в течение 8—12 недель. После уборки растений отдельно определяли сухой вес надземной и подземной части растений, а также количество, размер и окраску клубеньков.

При определении численности и веса клубеньков в качестве контроля использовали те бобовые растения, которые были инфицированы штаммами, выделенными с того же вида растения, а при определении содержания сухого вещества в надземной части и в корнях в качестве контроля использовали неинфицированные растения.

Полученные данные подвергались статистической обработке с применением дисперсионного анализа. Для оценки значимости различий между средними показателями различных совокупностей при ферментации углеводов применялся критерий Дункана (Дункан, 1955). Связь между содержанием сухого вещества в корнях и надземной части, а также между весом и количеством клубеньков определяли при помощи корреляционного коэффициента.

Наличие и морфология клубеньков и бобовых растений в Эстонской ССР и определяющие их факторы

Виды изученных бобовых растений и основные морфологические характеристики их клубеньков приведены в табл. 2. Как видно из этой таблицы, у всех этих видов, за исключением *Astragalus glycyphyllus*, имеются клубеньки. Но так как по данным Иенсена (Jensen, 1963) у этого вида тоже имеются клубеньки, то отсутствие их у 20 изученных

нами экземпляров из двух районов (Раквереский и Кингисеппский) Эстонской ССР объясняется, по-видимому, неблагоприятными почвенными условиями для образования клубеньков в этих местах (pH_{KCl} — 5,0—5,7; P_2O_5 — 1,0—1,5 мг%; K_2O — 4—5 мг%).

Клубеньки размещаются как на главном, так и на боковых корнях и тесно ими оплетены. Поверхность клубеньков бывает гладкой или шероховатой. Форма и размеры клубеньков варьируются в зависимости от вида растения-хозяина и свойств почвы.

Самые большие клубеньки (5—8 мм) бывают у *Lathyrus odoratus*, *Lath. maritimus*, *Astragalus danicus*, *Vicia sylvatica*, *Vicia faba*, *Phaseolus vulgaris*, *Lupinus luteus* и *Lupinus polyphyllus*; самые маленькие (0,5—1,5 мм) — у *Lotus corniculatus* и у различных видов *Trifolium*. У остальных видов средний диаметр клубеньков колеблется в пределах от 2 до 4 мм.

Корреляционный анализ, проведенный нами для выяснения связи между высотой растения и размерами его клубеньков (см. табл. 3), свидетельствует о том, что у большинства видов соответствующий коэффициент корреляции является статистически незначимым. При вычислении же частных коэффициентов корреляции (исключая влияние количества клубеньков) выяснилось, что имеется достоверная положительная корреляция между размерами клубеньков и высотой растений у большинства видов (*Lathyrus vernus*, *Lath. sylvestris*, *Trifolium arvense*, *Trif. repens*, *Vicia sylvatica*, *Vicia sativa*, *Ononis repens*, *Ononis arvensis*, *Lotus corniculatus*, *Anthyllis Vulneraria* и *Medicago lupulina*. А так как высота растений в свою очередь имеет большую зависимость от содержания в них азота, то из статистического анализа следует, что при наличии больших клубеньков происходит и большее связывание азота. Но еще больше высота растений, а вместе с ней и количество связанного азота зависит от количества клубеньков ($r = 0{,}7 \div 0{,}8$). Эти два показателя — количество и величина клубеньков — находятся в обратной зависимости друг от друга, чем меньше клубеньков, тем больше они по размерам при одинаковой высоте растений.

Форма клубеньков интересовала нас как возможный вспомогательный критерий при классификации клубеньковых бактерий. Мы выяснили, что морфология клубеньков на корнях бобовых значительно варьируется не только в пределах одного и того же рода, но и вида. Так, у различных видов *Trifolium* имеются круглые и палочковидные клубеньки, а у видов *Vicia* — круглые, палочковидные и лапчатые. У родов *Tetragonolobus*, *Lotus*, *Oxytropis*, *Ononis*, *Anthyllis* имеются только круглые, а у растений из рода *Medicago* — только лапчатые клубеньки.

Цвет клубеньков зависит от их возраста. В начале развития они

бывают белыми, розовыми или красновато-коричневыми, а с возрастом становятся коричневыми или коричнево-черными.

Для более полного выяснения связей между ростом растений и свойствами клубеньков нами был вычислен объем клубеньков по их количеству и размерам. Как показал анализ, высота растений в большинстве случаев сильно связана с объемом клубеньков. У десяти из одиннадцати изученных нами видов соответствующий коэффициент корреляции статистически высокодостоверен (см. табл. 3). Исключение составляет только *Trifolium arvense*, у которого высота растения больше всего связана с количеством клубеньков, а размеры клубеньков обратно пропорциальны их количеству.

Путем сопоставления основных свойств бобовых и их клубеньков, а также агрохимических свойств почвы их ризосферы нам удалось выявить некоторые общие закономерности. Так, количество клубеньков на корнях бобовых растений, а также их размеры и объем в большей степени зависят от pH почвы. В 18 из 22 случаев большей концентрации водородных ионов соответствовали большее количество и объем клубеньков. Например, у *Vicia sylvatica* при pH_{KCl} 4,6 имелось 9 клубеньков, а при pH_{KCl} 7,0 их было 22; у *Lathyrus sylvestris* при pH_{KCl} 5,8—5 и при pH_{KCl} 7,0—13; у *Lathyrus vernus* при pH_{KCl} 5,7—3 и при pH_{KCl} 6,9—16; у *Lotus corniculatus* при pH_{KCl} 4,7—4 и при pH_{KCl} 7,0—12 и т. д. Аналогично большему содержанию легкорастворимых K_2O и P_2O_5 соответствовало и большее количество клубеньков. Но зато их соотношение (K_2O/P_2O_5) влияло на рост скорее всего противоположным образом. В 15 из 22 случаев большему соотношению K_2O/P_2O_5 соответствовало меньшее количество и рост клубеньков. Самым благоприятным для бобовых растений считается соотношение $K_2O/P_2O_5 = 1 : 1{,}72$ (Гельцер, 1948).

По данным анализов, в Эстонии, как правило наблюдаются значительные отклонения от этого идеального соотношения калия и фосфора.

Вслед за количеством и размером клубеньков с pH почвы коррелирует и рост бобовых растений. Особенно заметно проявляется это у *Lathyrus sylvestris* (pH_{KCl} 5,8 и 7,0 и высота растения соответственно 37 и 73 см) и *Vicia sylvatica* (pH_{KCl} 5,1 и 7,0, высота 58 и 69 см). В двух случаях (у *Trifolium arvense* и *Medicago lupulina*) при увеличении pH почвы высота растений не изменилась.

По отношению к pH почвы бобовые растения подразделяются на две группы. Первую из них составляют виды, у которых образование клубеньков происходит в широком интервале pH почвы: *Lotus corniculatus* (pH_{KCl} 4,7—7,0), *Vicia sylvatica* (pH_{KCl} 4, 4,6—7,1), *Vicia sativa* (pH_{KCl} 5,1—7,0), *Lathyrus vernus* (pH 5,7—6,9), *Lathyrus sylvestris* (pH_{KCl} 5,8—7,0), *Trifolium repens* (pH_{KCl} 5,9—7,0) и *Trifolium arvense* (pH_{KCl} 6,0—7,0). К другой группе относятся виды, у которых симбиоз

с клубеньковыми бактериями происходит только в узком интервале pH почвы: *Ononis repens* (pH_{KCl} 6,8—7,2), *Ononis arvensis* (pH_{KCl} 6,8—7,3), *Anthyllis vulneraria* (pH_{KCl} 7,0—7,4) и *Medicago lupulina* (pH_{CKl} 6,9—7,3).

Таким образом, самыми чувствительными к pH почвы являются клубеньковые бактерии, обитающие на видах *Medicago*, *Ononis* и *Anthyllis*, и самыми резистентными — бактерии, обитающие на видах *Vicia*, *Trifolium*, *Lathyrus* и *Lotus*.

Анализы почвенных проб показали, что большинство бобовых растений в Эстонской ССР произрастает на дерново-карбонатных и дерново-глееватых почвах.

Данные наших исследований также подтверждают то, что для усиления эффективности симбиоза растений с клубеньковыми бактериями необходимо учитывать весь комплекс факторов внешней среды.

Морфологические, физиологические и биохимические свойства клубеньковых бактерий

Для первоначальной проверки чистоты бактериальных культур, выделенных из клубеньков бобовых растений, мы изучали рост этих культур на двух средах — на x_3 (Рахно, 1960) и мясопептонном агаре (МПА), так как известно (Allen, Allen, 1950), что *Rhizobium* (за исключением *Rh. meliloti*) совсем не растет или растет, но очень плохо не среде МПА, в то время как *Agrobacterium radiobacter* растет на ней исключительно хорошо.

Опыты показали, что 11 из 38 изученных нами штаммов, способны расти и образовывать колонии на среде МПА. Шесть из этих штаммов относятся к *Rh. meliloti*. Все они на 4—5-й день инкубации образуют крупные светлосерые колонии диаметром 2—4 мм.

Из 5 остальных штаммов два относятся к *Rh. leguminosarum*, один — к *Rh. trifolii*, а два были выделены нами из клубеньков *Astragalus danicus* и *Ononis repens*, данные о видовой принадлежности которых в существующих определителях отсутствуют. Штаммы бактерий, выделенных из клубеньков *Vicia sylvatica*, *Lathyrus sylvastris* и *Trifolium hybridum*, образовывали на среде МПА маленькие полупрозрачные светло-серые круглые колонии только в тех случаях, если эти растения прежде росли на щелочных почвах ($pH > 7$). Если все же бактерии были выделены с *Vicia sylvatica* и *Lathyrus sylvestris*, растущих на кислых почвах (pH от 4 до 6), то способность образовывать колонии на этих средах отсутствовала.

Штамм, выделенный с *Ononis repens* образовывал светло-серые полупрозрачные слизистые колонии. Такие же колонии образовывал и штамм, выделенных с *Astragalus danicus*, но отличающийся от предыдущего мень-

шей интенсивностью роста. В общих чертах эти два штамма по характеру роста на среде МПА были очень сходны со штаммами *Rh. meliloti*, но отличались от последних меньшими размерами колоний. Аналогичные данные были получены нами при изучении роста на среде x_3.

Окрашивание препаратов культур по методу Грама показало, что все изученные нами штаммы являются грам-отрицательными. Все клубеньковые бактерии — палочковидные и окрашиваются равномерно. Для изучения цикла развития клубеньковых бактерий мы исследовали аналогично одно-, двух- и четырехдневные культуры и обнаружили, что культуры разного возраста в значительной степени различаются по своим морфологическим свойствам. Так, 24-часовые культуры содержали только подвижные палочки с гомогенной протоплазмой. Зато в 48-часовых культурах преобладали уже вакуолизированные неподвижные палочки, хотя встречались и равномерно окрашенные гомогенные клетки. Это начало перехода бактерий в своем развитии в стадию «опоясанных» палочек. Четырехдневные культуры клубеньковых бактерий содержали только вакуолизированные и гранулированные палочки, полностью потерявшие двигательную активность. Встречались и маленькие коккоидные формы. Вся культура в своем развитии уже полностью перешла в стадию «опоясанных» клеток. Описанное выше чередование форм в ходе развития культур клубеньковых бактерий совпадает с данными предыдущих работ, указывающими на плеоморфизм *Rhizobia* в цикле его развития (Thornton, Gangulee, 1962; Lewis, 1938; Bisset, 1952; Stapp, Knösel, 1956). 24-часовые культуры, как наиболее подходящие для этой цели, мы использовали для электронно-микроскопического исследования бактериальных клеток.

Самые большие клетки содержатся в культурах клубеньковых бактерий, выделенных с *Lathyrus*, *Vicia*, *Trifolium*, *Medicago*, *Melilotus* и *Onobrychis*. Их длина 2,5—3,5 мкм, а диаметр 0,7—0,9 мкм. Средними по величине (длина 1,5—2,5 мкм, диаметр 0,5—0,8 мкм) являются бактерии, выделенные с *Phaseolus vulgaris*, *Ononis repens*, *Astragalus danicus*, *Oxytropis pilosa*, *Ornithopus sativus*, *Lupinus luteus*, *Genista* и *Soja*. Самыми маленькими являются клубеньковые бактерии, выделенные с *Lotus corniculatus*, *Anthyllis vulneraria* и *Tetragonolobus siliquosus* (длина 1,0—1,5 мкм, диаметр 0,3—0,6 мкм).

По количеству и расположению жгутиков клубеньковые бактерии подразделяются на две группы. У *Ornithopus sativa*, *Lupinus luteus*, *Ganista* и *Soja* они являются монотрихами, т. е. имеют один жгутик, прикрепленный к концу палочки. У остальных видов бобовых растений клубеньковые бактерии являются перитрихами. При этом интересно отметить, что монотрихами оказались именно медленнорастущие бактерии.

Культурные и физиологические свойства выделенных нами штаммов клубеньковых бактерий мы изучали на основной среде клубеньковых

бактерий (ОКБ), ОКБ с Конго красным и бобовом отваре с агаром. При этом мы определяли начало образования и скорость роста колоний, а также их форму, размер и цвет. По скорости образования колоний на этих средах все штаммы подразделялись на две основные группы — быстро и медленнорастущие штаммы. К последним относятся штаммы, выделенные из клубеньков *Ornithopus sativus*, *Lupinus luteus*, *Soja* и *Genista*. У них колонии образуются только на 8—10-е сутки. Все остальные штаммы — быстрорастущие (образование колоний на 3—5 сутки). Эти группы различаются и по свойствам колоний. Так, почти все без исключения быстрорастущие штаммы образовали круглые (диаметром (4—10 мм) полупрозрачные светлосерые слизистые колонии, а все медленнорастущие — маленькие (диаметром 1,5—2,0 мм), очень плотные и липкие колонии с молочно-белой опалесцирующей поверхностью. Различия между отдельными штаммами внутри этих основных групп являются значительно меньшими.

Скорость роста зависит также и от используемой питательной среды. На среде ОКБ с Конго красным образованием колоний клубеньковыми бактериями происходит раньше и размер колоний бывает больше, чем на ОКБ или бобовом отваре с агаром.

При культивировании клубеньковых бактерий в лакмусовом молоке также наблюдаются различия между быстро- и медленнорастущими группами. Так, все медленно растущие штаммы дают сильно щелочную реакцию, но не образуют сывороточную зону, зато быстрорастущие штаммы дают или кислую реакцию среды, или щелочную с образованием сывороточной зоны. Среди быстрорастущих штаммов в свою очередь наблюдаются три различных типа реакций: 1) Щелочная с зоной *Rh. leguminosarum*, *Rh. trifolii*, *Rh. phaseoli* (штаммы с *Lotus corniculatus*, *Anthyllis vulneraria*, *Tetragonolobus siliquosus*, *Astragalus danicus* и *Oxytropis pilosa*); 2) кислая реакция с зоной *Rh. meliloti* (штамм с *Ononis repens*) и 3) кислая реакция без сывороточной зоны (штамм с *Onobrychis viciifolia*).

При культивировании на желатине наблюдаются четыре типа роста (по форме кратера) и разжижения, которые, однако, плохо коррелируют с видами бактерий. Так, некоторые штаммы (с *Vicia sylvatica*, *V. cracca*, *Lathyrus vernus*, *L. niger*, *L. pisiformis*, *L. sylvestris*, *Pisum sativa*) и штаммы с *Astragalus danicus* и *Oxytropis pilosa* образуют кратер формы перевернутой елочки, а другие штаммы *Rh. leguminosarum* (с *Vicia sativa*, *V. sepius*, *V. faba*, *V. cassubica*, *Lathyrus palustre*, *Lens culinaris*) образуют кратер формы вьющейся ленты. Такая же форма наблюдается и у некоторых штаммов *Rh. trifolii* (*Trif., arvense*, *Trif. alpestre*, *Trif. pratense*, *Trif. medium*, *Trif. fragiferum*) и у штамма с *Trigonella*. Остальные штаммы *Rh. trifolii* образуют нитевидный кратер, который толще на поверхности и заостряется внизу у дна пробирки.

Все медленнорастущие штаммы обнаруживают хороший рост в верхней части в виде белой плотной массы. Кратер же суживается резко, образует внизу иглообразное острие и напоминает воронку.

Желатин разжижают штаммы с *Melilotus*, *Medicago*, *Phaseolus vulgaris*, *Ononis repens*, *Lotus corniculatus*, *Anthyllis vulneraria* и *Tetragonolobus siliquosus*. Три последние штамма разжижают среду только в верхней поверхности, а остальные — всю питательную среду.

Резкие различия между медленно- и быстрорастущими штаммами клубеньковых бактерий наблюдаются в их способности и характере разлагать различные типы углеводов с образованием кислой или щелочной реакции (см. рис. 12 и 13 a, b). Все быстрорастущие штаммы превращают реакцию питательной среды в кислую. В ходе инкубации кислая реакция среды увеличивается. Скорость роста кислотности максимальна в начале инкубации, а затем постепенно уменьшается, однако рост кислотности не прекращается до самого конца периода наблюдения, то есть в течение трех месяцев. Интенсивность кислотообразования и ее динамика зависят от используемого в среде углевода. Наибольшая кислотность наблюдается при ферментации галактозы, арабинозы и глюкозы, значительно меньшая — при использовании инозита, сурбита, дульцита и мальтозы. При применении этих углеводов несколько различается и динамика роста кислотности. Если в начале инкубации они особенно сильно уступают первым в скорости роста pH среды, то к концу периода наблюдения она у них становится больше. Промежуточными как по скорости роста кислотности, так и по ее абсолютному значению были сахароза и глюкоза.

Все медленнорастущие штаммы в начале инкубации образуют щелочную реакцию среды, которая в течение первых двух недель увеличивается (см. рис. 12 A) в зависимости от используемого углевода и в меньшей степени — от штамма. На определенной стадии реакция останавливается и начинает смещаться в сторону кислой. При применении галактозы и арабинозы реакция среды проходит нейтральную зону через неделю после начала инкубации, а при применении глюкозы — через три недели и становится кислой. В дальнейшем кислотность среды увеличивается относительно быстро в течение трех месяцев. При применении остальных углеводов реакция среды остается щелочной даже через три месяца. Особенно высокая щелочность, которая растет почти до конца периода наблюдения, отмечается в среде, содержащей мальтозу. У сахарозы, лактозы, сорбита, инозита и дульцита максимальная щелочность наблюдается после двух недель инкубации.

В специальной серии опытов мы провели определение количества кислот, образованных в результате ферментации 9 углеводов в течение двух недель, путем титрования их с NaOH.

Дисперсионный анализ показал, что статистически значимые различия в кислотообразовании наблюдаются не только между видами клубеньковых бактерий, но и между отдельными штаммами, а также между различными углеводами и их группами.

Анализируя с помощью критерия Дункана статистически значимые различия, мы выяснили, что по средней способности кислотообразования при ферментации 9 углеводов все использованные нами штаммы делятся на 3 группы (см. рис. 13 *a*, *b*): 1) штаммы, превращающие среду при ферментации углеводов в щелочную; 2) штаммы с умеренной способностью кислотообразования (15—45 мкг/экв на 16^6 инокулированных клеток). В эту группу входят 26 штаммов четырех видов *Rhizobia*; 3) интенсивные продуценты кислот (60—70 мкг/экв на 10^6 клеток). В эту группу входят 8 штаммов трех видов *Rhizobia*. При этом интересно отметить, что в 6 случаях из 8 интенсивными кислотопродуцентами оказались штаммы, выделенные с бобовых, растущих на относительно щелочных почвах на острове Сааремаа. Это подтверждается и гипотезой Норриса (Norris, 1965) о том, что кислотообразование связано с адаптацией растений-хозяев к щелочным почвам. Различия между штаммами в пределах этих групп статистически незначимы.

Следует отметить также, что строгого соответствия между способностью к кислотообразованию и видовой принадлежностью не существует. Некоторые штаммы одного и того же вида могут входить в группу умеренных кислотообразователей, в то время как другие являются интенсивными продуцентами кислот, о чем свидетельствуют средние показатели 9 углеводов.

Оценивая значимость различий между видами, мы выяснили, что по средним показателям *Rh. phaseoli*, *Rh. trifolii*, *Rh. leguminosarum*, а также *Rh. simplex* не различаются и образуют одну группу. Значительно меньше образуют кислот штаммы *Rh. meliloti* и штаммы, выделенные с *Ononis repens*, *Tetragonolobus siliquosus*, *Lotus corniculatus*, *Anthyllis vulneraria*. А штаммы, выделенные с *Oxytropis pilosa* и *Astragalus danicus*, наоборот, образуют значительно больше кислот, чем штаммы видов *Rh. plaseoli*, *Rh. trifolii*, *Rh. leguminosarum* или *Rh. simplex*. От всех других отличаются *Rh. lupini* и *Rh. japonicum*, превращающие среду при ферментации углеводов, как правило в щелочную, но между собой не различающиеся (табл. 15).

Хотя классификация клубеньковых бактерий на основании групп перекрестного заражения и не соответствует полностью их естественному группированию по биохимическим (ферментативным) свойствам, тем не менее существует определенная корреляция между их принадлежностью к той или иной группе по способности к кислотообразованию при ферментации углеводов и трибами растения-хозяина (табл. 16).

Способность того или иного штамма клубеньковых бактерий образовывать в среде кислую или щелочную реакцию зависит от конкретного используемого углевода, а группировка различных штаммов *Rhizobium* остается в основном одной и той же.

Анализируя различия между отдельными углеводами и их типами по эффективности кислотообразования при их ферментации клубеньковыми бактериями, мы выявили три группы (по убыванию их эффективности): 1) арабиноза, галактоза, глюкоза, сахароза и маннит, 2) лактоза и 3) мальтоза, сорбит и инозит.

Симбиотические свойства клубеньковых бактерий

Симбиоз клубеньковых бактерий с бобовыми растениями имеет не только огромное практическое значение для народного хозяйства как способ повышения урожайности сельскохозяйственных культур и азотного удобрения почвы, но и является одним из интереснейших загадочных явлений в биологии, основные теоретические аспекты которого остаются все же нерешенными, несмотря на значительные усилия исследователей.

В настоящей работе мы исследовали симбиотические свойства 36 штаммов клубеньковых бактерий, заражая ими в стерильных условиях в лаборатории семена 11 видов бобовых растений. При этом основное внимание мы сосредоточили на определении вирулентности различных штаммов клубеньковых бактерий по их способности образовывать клубеньки, т. е. вступать в симбиоз с различными бобовыми растениями, и на эффективности этих симбиотических комбинаций по относительному увеличению сухого веса (в процентах) растений в симбиозе по сравнению с незараженными контрольными растениями.

Из 303 изученных нами комбинаций заражения бобовых растений клубеньковыми бактериями в 128 наблюдалось образование корневых клубеньков, т. е. симбиоз (см. рис. 21). При изучении же эффективности этих комбинаций (по увеличению сухого веса растений по сравнению с незараженным контролем) выяснилось, что существует два типа симбиоза — в одних случаях эффективность составляет около 100% (так называемый эффективный симбиоз), а в других случаях — около 0% (так называемый неэффективный симбиоз) (см. рис. 24). Эффективности около 50% почти не наблюдается. Двухвершинность распределения эффективности также была доказана статистически с высокой степенью достоверности. При неэффективном симбиозе значительно меньше не только количество клубеньков, но и их суммарный вес. Эффективный симбиоз всегда наблюдается при заражении бактериями бобовых растений того же вида, из клубеньков которых они были выде-

лены, или при заражении других видов, но из той же группы перекрестного заражения.

Интересно отметить, что во всех 27 комбинациях перекрестного заражения растений из группы лядвенца (*Lotus corniculatus*, *Anthyllis vulneraria* и *Tetragonolobus siliquosus*) штаммами клубеньковых бактерий из группы *Rh. leguminosarum* и наоборот, наблюдалось образование клубеньков. При этом в 23 случаях симбиоз оказался эффективным (см. рис. 21).

Эти данные свидетельствуют о том, что группа лядвенца составляет с *Rh. leguminosarum* одну общую группу перекрестного заражения.

Штамм с *Ononis repens* вступил в эффективный симбиоз с *Melilotus albus* и образовал клубеньки на *Medicago sativa*. Следовательно, *Ononis repens* образует с последними общую группу перекрестного заражения.

Эффективный симбиоз наблюдался и при заражении *Astragalus danicus* штаммами, выделенными с *Oxytropis pilosa* и *Caragana arborescens*, однако штамм, выделенный с *Astragalus danicus*, не образовывал клубеньков на *Caragana arborescens*. А штамм, выделенный с *Caragana arborescens*, образовал клубеньки на *Vicia sepium* и *Vicia cracca* и дал эффективный симбиоз с *Lathyrus pratensis*. Вопрос о видовой принадлежности этих штаммов еще нельзя считать окончательно решенным.

Наши опыты показали, что довольно часто многие штаммы *Rhizobium* образуют клубеньки и на бобовых растениях из других групп перекрестного заражения, но, как правило, симбиоз при этом оказывается неэффективным или малоэффективным. Так, например, на *Medicago sativa* и *Melilotus albus* клубеньки образуют не только штаммы *Rh. meliloti*, но и *Rh. trifolii*, *Rh. leguminosarum*, *Rh. lupini*, *Rh. simplex*, а также штаммы с *Astragalus danicus*, *Caragana arborescens*, *Lotus corniculatus*, *Onobrychis viciifolia* и т. д. (см. рис. 21).

Следовательно, разграничить группы перекрестного заражения по одному только факту образования корневых клубеньков очень трудно. Более четкую группировку можно сделать при учете эффективного симбиоза.

В наших опытах эффективность разных симбиотических комбинаций мы изучали не только по увеличению скорости роста сухого вещества как основного критерия эффективности, но и по другим критериям: 1) по количеству клубеньков, 2) по суммарному весу клубеньков, 3) по сухому весу корней. Статистический анализ соответствующих данных показал, что все они коррелятивно связаны между собой. Самая сильная связь имеет место между содержанием сухого вещества в надземных частях растения и суммарным весом клубеньков ($r = 0{,}696$). Коэффициент корреляции между сухим весом корней и количеством клубеньков составляет $r = 0{,}589$ и является высокодостоверным.

Выводы:

1. Получены данные о наличии и свойствах клубеньков у 46 видов бобовых из 16 родов (всего 690 растений), растущих в Эстонской ССР:

а) клубеньки расположены на всей корневой системе, но больше всего их на боковых корнях;

б) клубеньки различаются как по величине, так и по форме. Эти различия определяются как свойствами растения (его вид и род), так и свойствами почвы (ее вид, pH, содержание легкорастворимого фосфора и калия и т. п.);

в) цвет клубеньков зависит от их возраста. В начале развития они бывают белыми, розовыми или красновато-коричневыми, а с возрастом становятся коричневыми или коричневато-черными.

2. Разные штаммы, выделенные из клубеньков бобовых растений по своим средним морфологическим признакам изменяются мало. Общее сходство не позволяет классифицировать их по видам, а только лишь по растениям-хозяевам:

а) все исследованные нами штаммы клубеньковых бактерий оказались грам-отрицательными;

б) размеры бактерий варьируют в зависимости от растения-хозяина в следующих пределах: длина — от 1 до 3,5 мкм, диаметр — от 0,3 до 0,9 мкм;

в) по скорости образования колоний на искусственных средах изученные нами штаммы подразделяются на две основные группы — медленно- и быстрорастущие. К медленнорастущим относятся штаммы, выделенные из клубеньков *Ornithopus sativus*, *Lupinus luteus*, *Soja* и *Genista*. Все остальные штаммы, изученные в настоящей работе, являются быстрорастущими;

г) все клетки медленнорастущих штаммов являются монотрихами с одним субполярным шгутиком. При культивировании в лакмусовом молоке они дают щелочную реакцию, но сывороточную зону не образуют. Не способны они также разжижать желатину.

У бактерий быстрорастущих штаммов жгутики расположены по всей поверхности клетки и являются перитрихами. При выращивании в лакмусовом молоке они образуют кислую или щелочную реакцию с сывороточной зоной. Желатину способны разжижать штаммы, выделенные с *Melilotus*, *Medicago*, *Phaseolus vulgaris*, *Ononis repens*, *Lotus corniculatus*, *Anthyllis vulneraria* и *Tetragonolobus siliquosus*. При применении трех последних штаммов наблюдается лишь слабое разжижение верхней части среды после 4-недельной инкубации. При применении остальных штаммов разжижается вся среда;

д) все штаммы *Rhizobium* способны разлагать все использованные в опытах углеводы (арабинозу, галактозу, глюкозу, маннит, сахарозу,

лактозу, мальтозу, сорбит, инозит и дульцит). При ферментации углеводов в среде возникает кислая или щелочная реакция. По реакции среды при ферментации углеводов и динамике ее изменения все штаммы *Rhizobium* подразделяются на две группы:

1) штаммы, образующие при ферментации кислую реакцию среды (все быстрорастущие штаммы), и 2) штаммы, которые при ферментации углеводов в начале инкубации образуют щелочную реакцию, которая в дальнейшем в зависимости от углевода или увеличивается, или уменьшается и превращается затем в кислую реакцию (все медленнорастущие штаммы).

По интенсивности кислотообразования при ферментации углеводов быстрорастущие штаммы также подразделяются на две группы: 1) умеренные, которые образуют за две недели инкубации при 28° С в среднем 14—45 мкг-экв кислот на 10^6 клеток, и 2) интенсивные, образующие в тех же условиях 60—75 мкг. экв. кислот на 10^6 клеток. Из изученных нами штаммов умеренными оказались 26, а интенсивными — 8 штаммов.

д) количество кислот, образующихся при ферментации углеводов, зависит от типа последних. Больше всего кислот образуется при разложении арабинозы, галактозы, глюкозы, сахарозы и маннита, значительно меньше — при разложении мальтозы, сорбита и инозита. Промежуточной является лактоза.

3) Существует связь между кислотообразовательной способностью клубеньковых бактерий и трибом хозяина-растения, а именно: штаммы, выделенные с растений одного и того же триба, относятся по кислотообразованию почти все без исключения к одной и той же группе.

4) Рост бобовых зависит от количества и веса клубеньков, а количество клубеньков, в свою очередь, коррелирует с pH почвы и содержанием в ней фосфора и калия.

Сухой вес растений и корней находится в коррелятивной связи с количеством и весом клубеньков. От суммарного веса клубеньков он зависит больше, чем от их количества.

5) Изученные нами клубеньковые бактерии по их отношению к pH почвы подразделяются на две группы: 1) клубеньковые бактерии, которые хорошо растут в широком диапазоне pH (4,6—7,1) почвы; к ним относятся штаммы, выделенные с *Vicia*, *Lathyrus*, *Trifolium* и *Lotus*; 2) клубеньковые бактерии, которые растут только в узком интервале pH (6,8—7,4); к ним относятся штаммы, выделенные с *Medicago*, *Ononis*, *Anthyllis*.

6) При заражении бобовых растений клубеньковыми бактериями, выделенными с растений того же вида, всегда возникает эффективный симбиоз. При заражении бобовых штаммами, выделенными с растений

другого вида, во многих случаях образуются клубеньки, но симбиоз при этом часто бывает неэффективным. Эффективный симбиоз, как правило возникает тогда, когда заражаемое растение принадлежит к той же группе перекрестного заражения, к которой относится и растение, с которого был выделен данный штамм.

В опытах перекрестного заражения наблюдается два типа симбиоза клубеньковых бактерий с бобовыми. В случае эффективного симбиоза рост растения (по сухому весу) происходит в среднем в два раза быстрее, чем у незараженных растений. В случае неэффективного симбиоза достоверного увеличения скорости роста растения не происходит.

7) Группирование клубеньковых бактерий по биохимическим и инфекционным свойствам не соответствует существующей видовой классификации рода *Rhizobia*:

а) при ферментации углеводов одни штаммы какого-либо вида могут быть умеренными, в то время как другие штаммы того же вида — интенсивными кислотообразователями. Поэтому по средней способности к кислотообразованию достоверных различий между видами *Rh. phaseoli*, *Rh. trifolii* и *Rh. leguminosarum* нет. Они образуют одну группу (кислотообразование в среднем 40 мкг. экв.). Меньше их образует кислот *Rh. meliloti*, который вместе со штаммами *Ononis*, *Tetragonolobus*, *Lotus* и *Anthyllis* образует другую группу (кислотообразование в среднем 20 мкг. экв.). Отдельную (третью) группу образует особо интенсивные штаммы, выделенные с *Astragalus* и *Oxytropis* (кислотообразование 70 мкг. экв). Промежуточным между последними двумя группами является штамм, выделенный с *Onobrychis viciifolia*.

б) бобовые растения из группы лядвенца (*Lotus corniculatus*, *Anthyllis vulneraria* и *Tetragonolobus siliquosus*) образуют одну общую группу перекрестного заражения с *Rh. leguminosarum*. Таким образом, штаммы, выделенные с этих растений, относятся к виду *Rh. leguminosarum*.

в) штаммы, выделенные с *Ononis repens*, относятся к виду *Rh. meliloti*, а само растение вместе с *Medicago sativa* и *Melilotus albus* входит в одну и ту же группу перекрестного заражения.

г) *Oxytropis pilosa* и *Astragalus danicus* относятся к одной и той же группе перекрестного заражения, а обитающие на их корнях клубеньковые бактерии нельзя отнести ни к одному из существующих видов *Rhizobia*. Они образуют отдельную группу как по биохимическим, так и по инфекционным свойствам.

8) Полученные нами в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что существующая таксономическая классификация *Rhizobium* на основе групп перекрестного заражения их хозяев-растений не соответствует дифференцированию штаммов клубеньковых бактерий по их морфологическим, физиологическим и биохимическим свойствам, а так-

же по способности образовывать клубеньки. Варьирование биологических свойств и признаков штаммов одного и того же вида превышает варьирование средних свойств видов. Единственное и ясное и постоянное дифференцирование штаммов *Rhizobium* заключается в их подразделении на быстрорастущие и медленнорастущие. Клубеньковые бактерии, ассоциированные с определенными группами перекрестного заражения, скорее всего являются разными адаптивными формами биологически изменчивого *Rhizobium*.



TAHVEL 1. Kevadine seahernes ehk kevadine kurelääts – *Lathyrus vernus* (L) Bernh.



TAHVEL 2. Mets-seahernes – *Lathyrus sylvestris* L.



TAHVEL 3. Harilik koldrohi – *Anthyllis vulneraria* L. *s. str.*



TAHVEL 4. Magus hundihammas – *Astragalus glycyphyllus* L.

KIRJANDUSE LOETELU

Albrecht, A. W., 1937. Physiology of root nodule bacteria in relation to fertility levels in the soil. Proc. Soil Sci. Soc. Amer. 2, 315—27.

Allen, E. K., Allen, O. N., 1950. Biochemical and symbiotic properties of the *Rhizobia*. Bact. Rev., 14, 4, 273—330.

Allen, E. K., Allen, O. N., 1961. The scope of nodulation in the *Leguminosae*. Recent Advances in Botany I, 585—588, IX Int. Botan. Congr. Montreal 1959 (1961).

Allen, O. N., 1953. Experiments in Soil Bacteriology. Minneapolis, Minnesota, Burgess Publishing Co.

Allen, O. N., Allen, E. K., 1947. A survey of nodulation among leguminous plants. Proc. Soil Sci. Soc. Amer., 12, 203—8.

Allen, O. N., Baldwin, I. W., 1954. *Rhizobia*-legume relationships. Soil. Sci., 78, 6, 415—27.

Allison, F. E., Minor, F. W., 1940. The effect of temperature on the growth rates of rhizobia. Journ. Bact., 39, 365.

Anderson, A. J., Thomas, M. P., Oertel, A. C., 1946. Plant responses to molybdenum as a fertilizer. I Molybdenum and symbiotic nitrogen fixation. Bull. Coun. sci. industr. Res, Aust., 198, 24.

Appleman, M. D., Barnes, M. R., Sears, O. H., 1942. Some morphological characteristics of nodule bacteria as shown by the electron microscope. Proc. Soil Sci. Soc. Amer, 7, 269—71.

Aughtry, J. D., 1948. Effect of genetic factors in *Medicago* on symbiosis with *Rhizobium*. Mem. Cornell Univ. agric. Exp. Sta., 280, 18.

Baird, K. J. 1955. Clover root nodule bacteria in the New England region of New South Wales. Aust. Journ. agric. Res., 6, 15—26.

Bañados, L. L., Fernandez, W. L., 1954. Nodulation among the *Leguminosae*. Philipp-Agric., 38, 529—33.

Balassa, G., 1963. Genetic transformation of *Rhizobium*; a review of the work of R. Balassa. Bacteriol. Revs., 27, 2, 228—41.

Balassa, R., 1954. Transformations-mechanismen der *Rhizobien*., Acta Microbiologica, sci. Hung., 2, fasc. 1—2, 51—78.

Baldwin, I. L., Fred, E. B., 1927. Fermentation characters of the root nodule bacteria of the leguminosae. Soil Sci., 24, 217—230.

Bauer, N., 1960. A probable free-radical mechanism for symbiotic nitrogen fixation. Nature, 188, 4749, 471.

Bewley, W. F., Hutchinson, H. B., 1920. On the changes trough which the nodule organism *(Ps. radicicola)* passes under cultural conditions. Journ. Agricult. Sci., 10, 144.

Becking, J. H., 1961. Molybdenum and symbiotic nitrogen fixation by alder *(Alnus glutinosus)*. Nature, 192, 4808, 1204—1205.

Beijerink, M. W., 1888. Die Bacterien der Papilionaeceen- Knöllchen. Botan. Zeitung, 46, 726—804.
Bergersen, F. J., 1961. The growth of *Rhizobium* in synthetic media. Austral. Journ. Biol. Sci., 14, 3, 349—60.
Bergeys, D. H., 1957. Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore, Williams and Wilkins.
Bialosuknia, W., Klott, C., 1923. *Badania* nad *Bacterium radicicola.* Roczn. Nauk Poln., 9, 288.
Bisset, K. A., 1952. Complete and reduced life-cycles in *Rhizobium.* Journ. gen. Microbiol. 7, 233—42.
Bjälfve, G., 1933. Baljväxternas rotknälar deras utseende och verkan hos olika sorter. Medd. Centr Anst. Försörsv. Jordbr., Stockh., 434.
Bjälfve, G., 1937. Baljväxternas rotknölar hos olika sorter baijäxternas kvävehalt samt deras kvävehushallning i akerjerden. Medd. Centr Anst. Försöksv. Jordbr., Stockh., 455.
Bjälfve, G., 1963. The effectiveness of nodule bacteria. Plant and Soil, 18, 1, 70—76.
Bond, L., 1948. Origin and developmental morfology of root nodules of *Pisum sativum.* Bot. Gaz., 109, 411—34.
Bonnier, C., 1957. Symbiose *Rhizobium*-legumineuse en region equatoriale. Inst. National etude Agron. Congo Belge, Serie Scient. 72, 67.
Bonnier, C., 1960. Symbiose *Rhizobium*-legumineuses; aspects particuliers aux regions tropicales. Ann. Inst. Pasteur, 98, 4, 537—56.
Boussingault, T. I., 1838. Recherches chimiques sur la vegetation enterprises dans le but d'examiner si les plantes prennent de l'azote de l'atmosphere. Annal. Chim. et Phys., 67, 1—54.
Bryan, O., 1923. Effect of reaction on growth, nodule formation and calcium content of alfalfa and red clover. Soil Sci., 15, 23—35 ja 37—40.
Burrill, T. J., Hansen, R., 1917. Is symbiosis possible between legume bacteria and non-legume plants. Illinois Agr. Exp. Sta. Bul., 202, 115—181.
Bushnell, O. W., Sarles, W. B., 1937. Studies on the root-nodule bacteria of wild leguminous plants in Wisconsin. Soil Sci., 44, 409—23.
Cabezas de Herrera, E., 1956. Infection de diferentes generos de leguminosas con una estirpe de *Rhizobium* procedente de *Lupinus angustifolius.* I. An. Edafol. Fisiol. veg., 15, 167—84.
Carroll, W. R. 1934a. A study of *Rhizobium species* in relation to nodule formation on the roots of Florida legumes. I. Soil Sci., 37, 117—41.
Carroll, W. R., 1934b. A study of *Rhizobium species* in relation to nodule formation on the roots of Florida legumes. II. Soil Sci., 37, 227—41.
Chen, H. K., 1941. The limited numbers of nodules produced on legumes by different strains of *Rhizobium.* Journ. Agric. Sci., 31, 479—87.
Chen, H. K., Thornton H. G., 1940. The structure of infective nodules and its influence on nitrogen fixation. Proc. Roy. Soc. B, 129, 855, 208—29.
Cheniae, G. M. Evans H. I., 1960. Physiological studies on nodule-nitrate reductase. Plant Phys., 35, 4, 454—462.
Conklin, M. E., 1936. Studies of the root nodule organisms of certain wild legumes. Soil Sci., 41, 3, 167—85.
Conn, H. J., Elrod R. P., 1947. Concerning flagellation and motolity. Journ. Bact., 54, 681—87.
Deherain, P. P., Demoussy E., 1900. Sur la culture des lupins blancs. Compt. Rend. Acad. Sci., Paris, 130, 20—24.
Derx, H. G., 1953. Sur les causes de la distribution geographique limitec des *Beijerinckia.* Proc. 6 th int. Congr. Microbiol., 6, 354.

Diener, T., 1951, Über die Bedingungen der Wurzelknöllchenbildung bei *Pisum sativum L.* Phytopath. Z., 16, 2, 129—70.
Dormer, K. J., 1946. Vegetative morfology as a guide to the classification of the *Papilionatae.* New Phytol., 45, 145—61.
Enders, C., Kärnbach, R., 1937. Hefemessung mit dem Lange — Kolorimeter. Wochenschr, Brauer., 44, 185.
Erdman, L. W., 1948. Legume inoculation. Farmers Bulletin, U. S. Dept. Agric. No 2003.
Fähraeus, G., 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. Journ. gen. Microbiol., 16, 2, 374—381.
Frank, B., 1879. Über die Parasiten in der Wurzelanchwellung der Papilionaceen. Bot. Ztg., 37, 377—88, 393—400.
Fred, E. B., Baldwin, J. L., McCoy, E., 1932. Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. Madison, Univ. Wisconsin.
Fred, E. B., Davenport, A., 1918. Influence of reaction on nitrogen assimilating bacteria. Journ. Agr. Research. U. S., 14, 317—336.
Fred, E. B., Frazier, W. C., 1920. Resistance of legume bacteria to freezing temperature. Hoard's Dairymann, 59, 456—457.
Frey-Wyssling, A., 1948. The growth in surfance of the plant cell wall. Growth Symposium, 12, 151—69.
Frey-Wyssling, A., 1952. Growth of plant cell walls. Symp. Soc. Exp. Biol., 4. Structural aspects of cell physiology, 320—328.
Fujita, T., Mitsuishi, S., 1953. Cytological studies on the root nodules of peas. Proc. Crop. Sci. Soc. Japan, 22, 97—98.
Garman, H., Didlake, M., 1914. Six different species of nodule bacteria. Ky. Agr. Sta. Bul., 184, 342—63.
Georgi, G. E., Ettinger, J. M., 1941. Utilization of carbohydrates and sugar acids by the *Rhizobia.* Journ. Bact., 41, 323—63.
Georgi, G. E., Wilson, P. W., 1933. The influence of the tension of oxygen in the respiration of rhizobia. Arch. Microbiol., 4, 543.
Gibbson, A. H., 1963. Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. The effect of root temperature of recently nodulated *Trifolium subterranum L.* plants. Austr. Journ. biol. Sci., 16, 1, 28—42.
Graham, P. H., 1963. Antibiotic sensitivities of the root-nodule bacteria. Aust. Journ. biol. Sci., 16, 2557—559.
Graham, P. H., 1964. The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. Journ. gen. Microbiol., 35, 511—17.
Gregory, K. F., Allen, O. N., 1953. Physiological variation and host plant specificities of rhizobia isolated from *Caragana arborescens L.,* Canad. Journ. Bot., 31, 730—38.
Hansen, R., Tanner, F. W., 1931. The nodule bacteria of the *Leguminosae* with special reference to the mechanism of inoculation. Centbl. Bakt. (II), 85, 130—52.
Hellriegel, H., Wilfahrt, H., 1888. Untersuchungen über die Stickstoffnährung der *Gramineen* und *Leguminosen.* Ztschs. Ver. Rübenzuckerindustrie Deutsch. Reichs, 38, 234.
Hiltner, L., 1900. Über die Bacteroiden der Leguminosenknöllchen und ihre willkürliche Erzeugung Ausserhalb der Wirtzpfanzen. Centrbl. Bakt. (II), 6, 272—81.
Hofer, A. W., Baldwin, J. L., 1932. The growth of rhizobia upon rich nitrogenus media. Journ. Bact., 23, 65.
Holding, R. J., King, J., 1963. The effectiveness of indigenous populations of *Rhizobium trifolii* in relation to soil factors. Plant and Soil, 18, 2. 191—98.
Huertos, R. M., Küster, E., Flaig, W., 1955. Licht- und elektronmikroskopische Untersuchungen an L-Formen bei *Pseudomonas fluorescens, B. proteus* und *Rhizobium.* Ztbl. Bakt., I orig., 162, 1—2, 24—31.

Jakob, A., 1953. Der Boden. Berlin, Akademie Verlag.
Jamane, G., Higashi, S., 1963. Interspecific transformation of host — specificity in root nodule bacteria. Bot. Hag., Tokyo, 76, 898, 149—154.
Jensen, H. L., 1948. Nitrogen fixation in leguminous plants. VII. The nitrogen fixing activity of root nodule tissue in *Medicago* and *Trifolium*., Proc. Linn. Soc. N. S. W., 72, 265—91.
Jensen, H. L., 1958. The classification of the *Rhizobia*. In; Hallsworth E. G., 1958. Nutrition of the Legumes. London, Scientific Publications p. 75—86.
Jensen, H. L., 1963. Relations de la plante hote avec les *Rhizobium* du groupe *Lotus-Anthyllis*. Ann. Inst. Pasteur, 105, 2, 232—36.
Jensen, H. L., 1964. Om forholdet mellem vaertplanter og rodknoldbakterier hos nogle grupper af baelgplanter. Tidsskr. Planteavl., 68, 1, 1—22.
Joffe, A., Weyer, F., Saubert, S., 1961. The role of root temperature in symbiotic nitrogen fixation. S. Agric. Journ. Sci., 57. 10, 278—80.
Jones, D. G., 1963. Symbiotic variation of *Rhizobium trifolii* with S. 100 Nomark white clover *(Trifolium repens L.)*. Journ. Sci. Food and Agric., 14. 10, 740—43.
Jordan, D. C., 1962. The Bacteroids of the Genus *Rhizobium*. Bact. Rev., 26, 2, 119—137.
Jordan, D. C., Garrard, E. H., 1951. Studies on the root nodule bacteria. I. Detection of effective and ineffective strains. Canad. Journ. Bot., 29, 360—72.
Joshi, N. V., 1920. Studies on the root nodule organisms of the leguminous plants. India Dept. Agr. Mem., Bact. Sect. 1, 247—76.
Kalninš, A. D., 1962. Gruminbakteriju rašu savstarpejās attiecibas dažu abolinu sugu rizosfera. LPSR ZA Vestis, 2.
Kalninš, A. D., 1963. Slapekla savienojumu ietekme uz gruminbakteriju un tauvinziežu savstarpejam attiecibam. Latv. Lauksaimn. Akademijas Raksti, 12, 29—42.
Kellerman, K., 1912. The present status of soil inoculation. Centrbl. Bakt. (II), 34, 42—50.
Kleczkowska, J., Nutman, P. S., Bond, G., 1944. Note on the ability of certain strains of rhizobia from peas and clover to infect each others host plants. Journ. Bact., 48, 673—75.
Kleczkowski, A., Thornton, H. G., 1944. A serological study of root nodule bacteria from pea and clover inoculation groups. Journ. Bact., 48, 661—72.
Labaw, L. W., Mosley, V. M., 1954. Periodic structure in the flagella and cell walls of a bacterium. Biochem. Biophys. Acta, 15, 325—31.
Lange, R. T., Parker, C. A., 1960. The symbiotic performance of lupin bacteria under glasshouse and field conditions. Plant and Soil, 13, 2, 137—46.
Laurent, E., 1891. Recherches sur les nodosites radicales des legumineuses. Annal. Inst. Pasteur, 5, 105—39.
Leifson, E., Erdman, L. W., 1958. Flagellar characteristics of *Rhizobium species*. A. van Leeuwenhoek Journ. Microbiol. Serol., 24, 97—110.
Lemmermann, O., 1907. Untersuchungen über einige Ernährungunterschiededer *Leguminosen* und *Gramineen* und ihre wahrscheiliche Ursache, Landwirtsch. Vers. Sta., 67, 207.
Levin, A. P., Funk, H. B., Tendler, M. D., 1954. Vitamin B_{12}, rhizobia and leguminous plants. Science, 120, 784.
Lewis, J. M., 1938. Cell inclusions and the life cycle of rhizobia. Journ. Bact. 35, 573—87.
Ley, J. de, Rassel A., 1965. DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus *Rhizobium*. Journ. gen Microbiol., 41, 1, 85—91.
Ley, J. de, Manil, P., 1963. Les déshydrogénases des *Rhizobium*. Etude d'une souche «efficiente» et d'une souche «non efficiente» de *Rhizobium trifolii*. Annal. Inst. Pasteur, 104, 4, 524—28.

Liese, W., 1926. Über die Oberflächenbestimmung von Bakterien mit dem Nephelometer nach Kleinmann. Ztschr. f. Hyg., 105, 483.
Loneragan, J. F., 1960. The legume — *Rhizobium* symbiosis. Journ. Aust. Inst. Agric. Sci. 1, 26—31.
Löhnis, F., Hansen, R., 1921. Nodule bacteria of leguminous plants. Journ. Agr. Research. U. S. 20, 543—556.
Lynch, D. L., Sears, O. H., 1951. Differential response of strains of *Lotus* nodule bacteria to soil treatment practices. Proc. Soil. Sci. Soc. Amer. 15, 176—80.
Manil, P., 1958. The Legume — *Rhizobia* symbiosis. In: Hallsworth E. G., 1958. Nutrition of the Legumes. London, Scientific Publications p. 124—33.
Manil, P., 1963. Les *Rhizobium* et la fixation symbiotique de l'azote. A propos de la taxonomie et de la classification des *Rhizobium*. Quelques données, récentes sur le déterminisme biochimique de la fixation. Annal. Inst. Pasteur, 105, 1, 19—45.
Manninger, E., 1962. Biochemical examination of *Rhizobium* strains. Acta Microbiol. Acad. Scient. Hung., 9, 3, 219—25.
Manninger, E., Kerpely, A., Zámory, E., 1960. Adatok a *Rhizobium*-baktériumokkal végzeff tenyészedény kísérletek megbizhatóságához. Agrokem. es. talaj. 9, 1, 11—18.
Martin, W. P., 1948. Observations on the nodulation of leguminous plants of the southwest. U. S. D. A. Soil Cons. Serv., Regional Bull., 107. Plant Study Series 4., 10.
McCalla, T. M. 1937. Behavion of legume bacteria *(Rhizobium)* in relation to exchangeable calcium and hydrogen on concentration of the colloidal fraction of the soil. Bull. Missouri Coll. agric. Rec., 256, 44.
McLachlan, K. D. Norman, B. V., 1961. Phosphorus and symbiotic nitrogen fixation in subterranean clover. Journ. Austr. Inst. Agric. Sci., 27, 4, 244—45.
Michieis L., 1960. Action du cobalt et de la photoperiode sur l'acumulation de l'hemoglobine dans les nodules de lupin. Arch. Anternat. Physiol. et Biochim., 68, 5, 843—844.
Mudd, S., Lackman, D. B., 1941. Bacterial morphology as shown by the electron microscope. I. Structural differentiation within the streptococcal cell. Journ. Bact., 41, 415—420.
Mudd, S., Lackman, D. B., 1942. Bacterial morphology as shown by the electron microscope. III. Cell wall and protoplasm in a strain of fusobacterium. Journ. Bact., 44, 361—366.
Mulder, E. G., 1950. Molybdenum in relation to nitrogen fixation of leguminous crops. Trans. 4 th Inter. Congr. Soil Sci., 2. 124—27.
Muntner, S., 1926. Über Bakterien-Zahlung und — Grössenmessung in Aufschwemmungen (insbesondere Vaccinen) mittels des Kleimzählmethode. Centrbl. Bakt. (I), Abt. Orig., 114, 1, 50.
Müller, A., Stapp, C., 1925. Beiträge zur Biologie der Leguminosenknöllchenbakterien mit besonderer Berücksichtigung ihrer Artverschiedenheit. Arb. Biol. Reichsanst. Land. u Forstw., 14, 455—554.
Neal, O. R., Walker, R. H., 1935. Physiological studies on *Rhizobium*. IV. Utilizations of carbonaceous materials. Journ. Bact., 30, 173—187.
Norris, D. O., 1956. Legumes and the *Rhizobium* symbiosis. Empire Journ. Exp. Agr., 24, 247—270.
Norris, D. O., 1958. The role of calcium and magnesium in the nutrition of *Rhizobium*. Austral. Journ. Agr. Reseach, 10, 5, 651—698.
Norris, D. O., 1965. Acid.production by *Rhizobium* a unifying concept. Plant and Soil, 22, 2, 143—66.

Nowotny — Mieczynska, A., Zinkiewicz, J., 1959. Wplyw zywienia rosliny na aktywnosc *Rhizobium trifolii* w symbiozie z koniczyna. Acta microbiol. polon., 8, 3—4, 304—313.
Nutman, P. S., 1948. Physiological studies on nodule formation. I. The relation between nodulation and lateral root formation in red clover. Ann. Bot., Lond., 12, 81—96.
Nutman, P. S., 1949. Physiological studies on nodule formation. II. The influence of delayed inoculation on the rate of nodulation in red clover. Ann. Bot. Lond., 13, 261—83.
Nutman, P. S., 1949b. Nuclear and cytoplasmic inheritance of resistance to infection by nodule bacteria in red clover. Heredity, 3, 263—92.
Nutman, P., 1956. Influence of the legume in root-nodule symbiosis. Biol. Rev., 31, 109—51.
Nutman, P. S., 1958. The physiology of nodule formation. In Hallsworth. E. G., 1958. Nutrition of the Legumes. London, Scientific Publications.
Pacheco Basurco, J. C., 1964. Influencia del agregado de bifosfato de calcio y otras drogas al fluido inoculante de leguminosas. Rev. investig. agropecuar. Ser. 2, 1, 5, 67—84.
Pate, J. S., 1961. Temperature characteristics of bacterial variation in legume symbiosis. Nature 192, 4803, 637—39.
Pate, J. S., Dart, P. J., 1961. Nodulation studies in legumes. IV. The influence of inoculum strain and time of application of ammonium nitrate on symbiotie response. Plant and Soil, 15, 4, 329—46.
Pfeiffer, H., 1928. Die Stickstoffsammlung und die aus ihr zu Zichenden Rüchslüsse auf die Farmum gestaltung der Knöllchen-bakterien. Zentrbl. f. Bakt. (II), 73, 1—7, 28.
Piho, A., Kask, R., 1960. Eesti NSV mullaerimite iseloomustus (juhend mullastiku kaardistajatele). Tallinn.
Pražmovski, A., 1890. Die Wurzelknöllchen der Erbse. Landw. Vers. Sta., 38, 160—238.
Purchase, H. F., 1953. Nodule bacteria in the rhizophere. Rep. Rothamst. Exp. Sta., 66—67.
Pärsim, E. V., 1966. Mügarate esinemisest ja morfoloogiast Eestis kasvavatel liblikõielistel. Eesti NSV TA Toimet., Biol. Seeria, 15, 1, 16—28.
Pärsim, E. V., 1967. Hapete moodustumine süsivesikute fermenteerimisel *Rhizobium*'i poolt. Eesti NSV TA Toimet., Biol. Seeria, 16, 2, 163—74.
Pärsim, E. V., 1967. Juuremügarad liblikõielistel taimedel. Eesti Loodus, 8, 462—64.
Radulovitč, V., 1963. Uticaj inokulacije semena i klasifikacije kiselin zemljišta no broj bakterija *Rhizobium radicicola* var. *leguminosarum* u rizosferi grahorice — *Vicia sativa* Roth. Zemljište i biljka, 12, 1—3, 301—304.
Raggio, M., Raggio, N., Torrey, J. G., 1957. The nodulation of isolated leguminous roots. Amer. J. Bot., 44, 4, 325—334.
Rangaswami, G., Oblisami, G., 1962. Studies on some legume root nodule bacteria. Journ. Indian Soc. Soil Sci., 10, 3, 175—186.
Reid, J. J., 1936. The infective ability of rhizobia of the soybean, cowpea and lupin cross-inoculation groups. Ph. D. Thesis, University of Wisconsin.
Reid, J. J., Sarles, W. B., 1935. Growth and longelivity of *Rhizobia* on agar containing various energy sources. Journ. Bact., 30, 651.
Rippel-Baldes, A., 1952. Grundriss der Microbiologie. Berlin, Springer Verlag.
Roslycky, E. B., Allen, O. N., McCoy, E., 1962. Phages for *Agrobacterium radiobacter* with reference to host range. Journ. Microbiol., 8, 71.
Rovira, A. D., 1955. Factors influencing soil metabolism and relationship between plant roots and soil microorganisms. Thesis, University of Sydney.

Rovira, A. D., 1961. *Rhizobium* numbers in the rhizospheres of red clover and paspalum in relation to soil treatment and the numbers of bacteria and fungi. Austral. Journ. Res., 12, 1, 77—83.

Rouatt, J. W., Lochhead, A. G., 1955. Qualitative studies of soil microorganismus. Soil Sci., 2.

Sankaram, A., Raju, P. V., Kasaiah, S., 1963. Effect of phosphate on nitrogen fixing power of root nodule bacteria. Sci. and Cult., 29, 8, 406—407.

Scaede, R., 1932. Das Schicksal der Bakterien in den Knöllchen von *Lupinus albus* nebst zytologischen Untersuchungen. Zentebl. f. Bakt. (II), 85, 416—25.

Schloesing, T., Laurent, E., 1890. Recherches sur la fixation de l'azote libre les plantes. Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris), 111, 750—54.

Shaukat, A., Evans, H. J., 1959. Effect of cobalt on the growth of soybeans in the absence of supplied nitrogen. Biochem. and Biophys. Res. Communs., 1, 5, 271—75.

Shaukat, A., Evans, H. J., 1961. The essentiality of cobalt for soybean plants grown under symbiotic conditions. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 47, 1, 24—36.

Shaukat, A., Evans, H. J., 1962. The essentiality of cobalt for the growth of soybean *(Glycine max.)* under symbiotic conditions. Radioisotopes Soil-Plant Nutrit. Studies. Vienna, 259—274.

Simon, J., 1914. Über die Verwandschaftsverhaltnisse der Leguminosen Wurzel-Bakterien. Bakt. (II), 41, 470—80.

Smith, J. D., 1949. The concentration and distribution of Haemoglobin in the Root Nodules in Leguminous plants. Biochem. Journ., 44, 5, 585—91.

Smith, K. N., 1958. Bacteriology of the genus *Rhizobium*. In: Hallsworth E. G., 1958. Nutrition of the Legumes. London, Scientific Publications.

Stalder, L., 1952. Über Dispositionsverschiebungen bei der Bildung von Wurzelknöllchen. Phytopath. Z., 18, 4, 376—403.

Stapp, C., 1924. Zur Frage der Lebens und Wirksamkeitsbauern- der Knöllchenbakterien. Angew. Bot., 6, 152—59.

Stapp, C., Knösel, D., 1956. Fortgeführte Untersuchungen über den Entwicklungscyclus und die Karyologie sterbilden der Bakterien. Zentr. Bakter. II, 109, 416.

Stevens, J. W., 1925. A. study of various strains of *Bacillus radicicola* from nodules of alfalfa and sweet clover. Soil. Sci., 20, 45—66.

Tanner, J. V., Anderson, I. C., 1963. An external effect of inorganic nitrogen in root nodulation. Nature, 198, 4877, 303—304.

Talts, S., 1959. Selts kaunviljalised — *Leguminosales*. Eesti NSV floora 3, Tallinn.

Teijerina, G., 1956. Nuevos medios cultivo de *Rhizobium* para infeccion technica. Ann. Edatol. Fisiol. Veg, 15, 63—84.

Tešic, Z., Todoroviš, M., 1963. Jedan predlog za klasifikaciju kvržičnih bakterija. Zemljište i biljka., 12, 1—3, 279—85.

Tevari, G. P., 1963. Note on effects of soil sterilization and some mineral nutrients commercial strains of cowpea *Rhizobium* in Western Nigeria. Empire Journ. Exp. Agric., 31, 121, 50—52.

Thimann, K. V., 1936. On the physiology of the formation of nodules on legume roots. Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., 22, 511—14.

Thimann, K. V., 1939. The physiology of nodule formation. Trans. Third Comm. Int. Soc. Soil Sci. A, 24—28.

Thimann, K. V., 1965. Das Leben der Bakterien. VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 364—394.

Thornton, H. G., Gangulee, N., 1926. The life-cycle of the nodule organism *Bacillus radicicola* (Beij.) in soil and its relation to the infection of the host plant Roy. Soc. (London), Proc. Ser. B., 99, 427—51.

Thornton, H., 1930. The life cycles of bacteria. Med. Res. Council, 1, 170.
Thornton, H., The nodule bacteria and their host legumes: some problems that they still present. Science Progress, 42, 166, 185—204.
Toennies, G., Gallant, D., 1949. The relation between photometric turbidity and bacterial concentration. Growth, 13, 1, 7.
Tutin, T. G., 1958. Classification of the Legumes. In: Hallsworth E. G., 1958. Nutrition of the legumes. London, Scientific Publications.
Tuzimura, K., Watanabe, L. 1961. Estimation of number of root-nodule bacteria by a nodulation-dilution frequency method. Ecological studies of *Rhizobium* in soils. Part I. Soil Sci. and Plant Nutr., 7, 2, 61—65.
Tuzimura, K., Watanabe, I., 1962. Ecological studies of root-nodule bacteria. Part 2. The growth of *Rhizobium* in the rhizosphere of the host plant. Soil Sci. and Plant Nutr. 8, 2, 19—24. s
Utjovski, N. 1961. Meditsiiniline mikrobioloogia ja mikrobioloogiline tehnika. Tallinn.
Van Iterson, W., 1953. Some remarks on the present state of our knowledge of bacterial flagellation. Bacterial Cytology, Symposium 6th congress. Int. Microbiol. Rome, 24.
Van Schreven, D. A., 1958. Somle factors affecting the uptake of nitrogen by legumes. In: Hallsworth E. G., 1958. Nutrition of the Legumes. London, Scientific Publications.
Vincent, J. M., 1945. Host specifity amongst root nodule bacteria isolated from several host species. Journ. Aust. Inst. agric. Sci., 11, 3, 121—27.
Vincent, J. M., 1954. The root nodule bacteria of pasture legumes. Proc. Linn. Soc. N. S. W., 79, 4—22.
Vincent, J. M., 1962. Influence of calcium and magnesium on the growth of *Rhizobium*. Journ. Gen. Microbiol., 28, 4, 653—63.
Virtanen, A. I., 1928. Über die Einwirkung der Bodenazidität auf das Wachstum und die Zusammensetzung der Leguminosepflanzen. Biochem. Ztschr., 193, 300—12.
Virtanen, A. I., 1945. Symbiotic nitrogen fixation. Nature 155, 3947, 747—48.
Virtanen, A. I. 1953. Microbiology and chemistry of nitrogen fixation. Proc. Int. Bot. Congr. Stockholm, 7, 156—59.
Virtanen, A. I., Laine, T., 1946. Red, brown and green pigment in leguminous root nodules. Nature, 157, 3975, 25—26.
Virtanen, A. J., Jorma, J., Linkola, H., Linnasalmi, A., 1947. On the relation between nitrogen fixation and leghaemoglobin content of leguminous root nodules. 11. Acta chem. scand., 1, 90.
Vlamis, J., Schultz, A. M., Biswell, H. H., 1964. Nitrogen fixation by root nodules of western mountain mahogany. J. Range Manag., 17, 2, 73—74.
Wagenbreth, D., 1961. Ein Beitrag zur systematischen Einordung der Knöllchenbakterien durch Bestimmung des relativen Basengehaltes ihrer Desoxyribonucleinsäuren. Flora, 151, 2, 219—30.
Walker, R. H., 1928. Physiological studies on the nitrogen fixing bacteria of the genus *Rhizobium*. Iowa Agr. Col. Exp. Sta. Bul., 113, 371—406.
Warington, K., 1926. The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants. Ann. Bot., 40. 27—42.
Wass, A. F., 1919. The Influence of Low Temperature on Soil Bacteria. New York (Cornell) Agr. Expt. Sta. Hem., 27, 1039—1074.
Weber, E., 1961. Grundriss der biologishen Statistik. Jena, VEB Gustav Fischer Verlag.
Weibull, C., 1960. Movement. The Bacteria, 1, N. Y., London, 153.
Williams, L. F., 1952. Investigations into a method for counting the total number of bacteria in a suspension. Journ. Gen. Microbiol., 7, 1—2, 89.

Williams, L. F., Lynch, D. L. 1954. Inheritance of a nonnodulating character in the soybean. Agron. Journ., 46, 28—9.
Wilson, J. K., 1917. Physiological studies of the *Bacillus radicicola* of the soybean *(soja Max Piper)* and the factors influencing nodule production. Bull. Cornell agric. Exp. Sta. 386, 369—413.
Wilson, J. K., 1930. Seasonal variation in the number of two species of *Rhizobium* in soil. Soil Sci., 30, 289—96.
Wilson, J. K., 1939. A relationship between pollination and nodulation of the *Leguminosae*. Journ. Amer. Soc. Agron, 31, 2, 159—170.
Wilson, J. K., 1943. The nodulating performance of three species of legumes. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 9, 95—97.
Wilson, J. K., 1944. Over five hundered reasons for abandoning the cross-inoculation groups of the legumes. Soil Sci., 58, 61—69.
Wilson, J. K., 1945. Leguminous plants and their associated organisms. Cornell Univ. Agr. Exp. Sta., Mem. nr. 22.
Wilson, J. K., 1946. Variation in seed as shown by symbiosis Mem. Cornell Univ. agric. Exp. Sta., 272, 21.
Wipf, L., 1939. Chromsome numbers in root nodules and root tips of certain *Leguminoseae*. Bot. Gaz., 101, 51—67.
Wipf, L., Cooper, D. C., 1938. Chromosome numbers in nodules and roots of red clover, common vetch and garden pea. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 24, 87—91.
Wipf, L., Cooper, D. C., 1940. Somatic doubling of chromosomes and nodular infection in certain *Leguminosae*. Amer. Journ. Bot., 27, 9, 821—24.
Woronin, V. M., 1866. Über die bei der Schwarzerle *(Alnus glutinosa)* und bei der gewohnlichen Garten lupine *(Lupinus mutabilis)* auftretenden Wurzelanschwellungen. Mem. Acad. Imp. Sci. (St. Peterburg). 6, 7, 10.
Woronin, V. M., 1867. Observations sur certaines excrolssances que present les racines de laune et du lupin des jardins. Ann. Sci. Nat. Botan., Ser. 5, 7, 73.
Wright, W. H., 1925. The nodule bacteria of soybeans. I. Bacteriology of strains; II. Nitrogen — fixation experiments. Soil Sci., 20, 95—140.
Zipfel, H., 1911. Beiträge zur Morphologie und Biologie der Knöllchbakterien der *Leguminosae*. Centrabl Bakt. (II)., 32, 97—187.
Ziegler, H., 1956. *Bacterium radicicola* im elektronenmikroskop. Planta, 48, 266—268.

Бергерсен Ф., 1966. Азотофиксация в корневых клубеньках бобовых. IX международный конгресс по микробиологии. Симпозиумы, 69—72.
Березова Е. Ф., Доросинский Л. М., 1961. Бактериальные удобрения, Москва, 98—148.
Бернард В. В., 1937. Результаты применения нитрагина в опытных и хозяйственных условиях. Труды ВИУАА, 2, 15.
Булавская Е. С., 1959. Влияние молибдена на микрофлору бобовых культур. Тр. Горьковск. с.-х. опыт. станции, 118—123.
Буткевич В. С., 1942. Влияние температуры почвы на фиксацию молекулярного азота бобовыми. ДАН СССР, 35, 4, 322.
Буткевич В. С., Гунова М. М., 1941. Интенсивность фотосинтеза у бобовых питании связанным и свободным азотом. ДАН СССР, 31, 9, 9—36.
Вернер А. Р., Гордиенко Н. Я., 1967. Корневые клубеньки дикорастущих бобовых растений горного Алтая. Изд.-во «Наука», 23—37.
Гаркавенко А. И., 1962. Содержание витамина B_{12} и B_6 клубеньках чины. Изв. АН Молд. ССР, 7, 20—23.
Гельцер Ф. Ю., 1948. Новый способ получения активных клубеньковых бактерий. В сб.: Пути повышения активности клубеньковых бактерий. Москва, 42—56.

Голик М. Г., 1937. Инокуляция гороха и способы усиления ее эффективности. Канд. дисс. фонд. Библ. им. Ленина.
Гукова М. М., 1962. Зависимость симбиотического усвоения азота бобовыми растениями от температуры. Изв. АН СССР сер. биол., 6, 832—39.
Гусев Н. А., 1939. Влияние азота и соотношения фосфора и азота в удобрениях на урожай семян красного клевера. Хим. соц. земл., 3, 78—83.
Динчев Д., 1959. Влияние на фосфорното торене върху проникването на грудновите бактерии в корените на фасула. Научни тр. Ин-та почв. излед. Н. Пушкаров. кн. 5, 129—140.
Динчев Д., 1961. Распространение и вирулентность клубеньковых бактерий люцерны в почвах Болгарии. Изв. Центр. н-и ин-т почвознание и агротехн., 1, 29—54.
Дороспнский Л. М., Ламповщиков П. К., 1948. Влияние низких температур на эффективность нитрагина. Сб. «Пути повышения активности клубеньковых бактерий», стр. 95.
Дороспнский Л. М., Лазарева Н. М., 1966. О специфичности некоторых видов клубеньковых бактерий. IX международный конгресс по микробиол., тезисы докладов, B2/31, 290.
Дороспнский Л. М., Лазарева Н. М., Шамин А. А., 1960. О роли клубеньковых бактерий в азотном питании бобовых растений. Агробиология, 4, 594—602.
Дороспнский Л. М., Лазарева Н. М., Шамин А. А., Шехонина Е. Н., 1961. Взаимоотношения люпина с активности и неактивности клубеньковых бактерий. Тр. Всес. н-и ин-та с/х микробиол., т. 16, 94—104.
Дробков А. А., 1945. Значение радиоактивных элементов в развитии клубеньковых бактерий и усвоении ими молекулярного азота воздуха ДАН СССР, 49, 227.
Емцев В. Т., Шильникова В. К., Громыко Е. П., 1963. Естественная инокуляция растений кормовых бобов и фасоли в дерново-подзолистых почвах. Изв. ТСХА, 4.
Заремба В. П., Малинська С. М., 1963. Об участии клубеньковых бактерий в фосфорном питании бобовых небобовых растений. Сб. «Микроорганизмы в с.-х.» Москв. ун-т, 124—132.
Израильский В. П., 1951. Хранение клубеньковых бактерий в высушенном состоянии.
Израильский В. Т., Рунов Е. В., Бернард В. В., 1933. Клубеньковые бактерии и нитрагин. Сельхозгиз.
Имшенецкий А. А., 1963. Актуальные задачи микробиологии. Вестн. АН СССР, 3, 82—90.
Калининская Т. А., 1962. Биологическая фиксация азота атмосферы. Природа, 6, 106—107.
Калниньш А. Д., 1959. Влияние почвенных условий и растительности на распространение клубеньковых бактерий клевера. Тр. Ин-та микробиол. АН Латв. ССР, 7, Рига.
Калниньш А. Д., 1963. Активность и вирулентность клубеньковых бактерий клевера. Тр. Ин-та микробиологии АН Латв. ССР, II, 167—187.
Калниньш А. Д., 1965. Влияние минерального азота на эффективность симбиоза клубеньковых бактерий с бобовыми растениями. Сб. «Роль микроорганизмов в питании растений и повышении эффективности удобрений», Ленинград, 40—50.
Калниньш А. Д., Клинцаре А. Я., Межараупе В. А., 1962. Распространение клубеньковых бактерий бобовых в почвах Латвийской ССР и их взаимоотношения с другими микроорганизмами и высшими растениями. Сб. «Микроорганизмы и среда», Рига, 103—117.
Клинцаре А. Я., 1959. Изменение эффективности симбиоза *Rhizobium meliloti* в зависимости от наличия в почве микроорганизмов, влияющих на их рост. Тр. Ин-та микробиол. АН Латв. ССР, 8. 87—104.

Клинцаре А. Я., 1963. Влияние бора и молибдена на эффективность симбиоза клубеньковых бактерий у гороха. Тр. Ин-та микробиол. АН Латв. ССР, 18, 17—30.

Клинцаре А. Я., Креслиня Д. Я., 1963. Влияние микроэлементов на развитие азотофиксирующих бактерий в ризосвере сельскохозяйственных растений. Сб. «Почв. и с/х. микробиология», АН Узв. ССР, Ташкент, 155—162.

Ковровцева С. А., 1933. Влияние типа почвы и влажности на рост и размножение клубеньковых бактерий. Тр. Всес. ин-та с/х. микробиол., 5, 98.

Красильников Н. А., 1947. Распространение и активность азотфиксаторов. Агробиология, 5, 56.

Красильников Н. А., 1949. Определитель бактерий и актиномицетов. Изд-во АН СССР, М.—Л.

Красильников Н. А., 1958. Микроорганизмы почв и высшие растения. Изд-во АН СССР, М.

Красильников Н. А., Кореняко А. И., 1946. Влияние клубеньковых бактерий на азотфиксацию клевера в условиях стерильных культур. Микробиология, 15, 4, 279—283.

Крисс А. Е., Бирюзова В. И., Золковер А. М., 1948. Капельный диализ — метод приготовления биологических препаратов для электронной микроскопии. Микробиология, 17, 6.

Ламповщиков П. К., 1948. Естественная инокуляция клевера на различных почвах. Доклады ВАСХНИЛ, 1, 256.

Лопухина Г. И., 1964. Влияние удобрений на способность гороха фиксации азота. Доклады ВАСХНИЛ, 2, 10—12.

Меграбян А. А., 1946. Морфологические и физиологические свойства клубеньковых бактерий французской чечевицы. Микробиол. Сб. АН Арм. ССР, вып. 2, стр. 187.

Меграбян А. А., 1955. К биологии клубеньковых бактерий эспарсета. Вопросы с/х. и промышленной микробиологии. АН Арм. ССР, 2, (8), 139.

Мелкумова Т. А., 1957. О жгутиках у клубеньковых бактерий люцерны. Микробиология, 26, 3, 313.

Мелкумова Т. А., 1961. Распространение клубеньковых бактерий в хлопово-люцерновом севообороте в орошаемых почвах Кура-Арансинской низменности. Изв. АН Азерб. ССР, серия биол. и мед. н., II, 91—95.

Мишустин Е. Н., 1956. Микроорганизмы и плодородие почвы. М.

Мишустин Е. Н., 1962. Биологический азот в сельском хозяйстве и использование бактериальных удобрений. Доклад на научно-методическом совещании по бактериальным удобрениям. Л.

Мишустин Е. Н., 1965. Международный коллоквиум по проблеме «Метаболизм азота в почве». Изв. АН СССР, сер. биол., 4, 600—602.

Мишустин Е. Н., Бернард В. В., 1935. К вопросу о накоплении бобовыми атмосферного азота. Химизация соц. земледелия, II, 110.

Мишустин Е. Н., Петербургский А. В., 1965. «Технический» и «биологический» азот в земледелии СССР. Изв. АН СССР, сер. биол. 2.

Мулдер Э. Дж., Лай Т. А., Дилз К., Хауерс А., 1966. Влияние pH на симбиотическую фиксацию азота некоторыми бобовыми растениями. IX международный конгресс по микробиологии. Симпозиумы, 98—113.

Ницэ Л., 1958. Азотфиксирующая активность клубеньковых бактерий гороха и вики и динамика накопления азота в бобовом растении. Автореф. дисс. канд. биол. наук.

Ничипорович А. А., Перевозчикова М. Ф., 1929. Эффективность нитрагина по фону минеральных удобрений. Журнал «Маслобойножировое дело», 12.

Образцова А. А., 1937. Микробиологические основы сидерации и значение расы клубеньковых бактерий инокуляции бобовых растений. Тр. Ин-та физиологии растений им. Тимирязева, 1, 2, 235.
Омелянский В. Л., 1926. Устойчивость культур *Azotobacter croococcum* к высушиванию. Тр. с.-х. микробиол., 1.
Пейве Я. В., Жизневская Г. Я., 1961. Действие молибдена и меди на активность нитратредуктазы в растениях. Микроэлементы и урожай, АН Латв. ССР, Рига, 257.
Пейве Я. В., Жизневская Г. Я., Тенисоне И. В., 1965. Сравнительное изучение активности нитратредуктазы и дегидрогеназ в клубеньках люпина и кормовых бобов. Микроэлементы и продуктивность растений, Рига, Зинатне, 27.
Пейве Я. В., Сафонов В. И., Жизневская Г. Я., Дмитриева М. И., Немченко Г. И., 1966. Разделение гемоглобина из клубеньков люпина методом дискового электрофореза на полиакриламидном геле. Тез. совещ. по химии растительных белков. Кишинев.
Петербургский А. В., Сабо Б., 1962. Известкование почвы и внесение молибдена под бобовые культуры. Доклады ТСХА, 79, 21—27.
Петросян А. П., 1959. Экологические особенности клубеньковых бактерий в Армянской ССР. Ереван.
Петросян А. П., Мирзабекян Р. О., 1939. Морфологические изменения клубеньковых бактерий эспарцета в клубеньках в течение года. Микробиология, 8, 7, 894.
Пешков М. А., 1955. Цитология бактерий. Изд-во АН СССР, М.
Пехов А. П., 1962. Электронно-микроскопическое исследование бактерий и фагов. Изд-во МЛ., М.
Писцов П. М., 1929. Клубеньковые бактерии в новых районах культуры соевых бобов.
Пошон Ж., де Баржак Г., 1960. Почвенная микробиология. Изд-во ИЛ., М.
Прянишников Д. Н., 1945. Азот в жизни растений и в земледелии СССР. Изд-во АН СССР, М.
Разумовская З. Г., Васильева О. А., 1956. О влиянии клубеньковых бактерий на химический состав белка бобовых. Уч. зап. ЛГУ, 216, 41, 196—201.
Рассел Э. Д., 1955. Почвенные условия и рост растений. Изд-во ИЛ, Москва.
Ратнер Е. И., 1964. Молибден и проблема биологического азота в земледелии. Изв. АН СССР, сер. биол., 2, 223—243.
Рудаков К. М., Лопатина Г. В., Швецова О. И., 1936. Руководство по нитрагинизации бобовых культур Изд-во ВАСХНИЛ.
Сорсон Х. Г., 1937. Отношения между почвенными бактериями и высшими растениями. Новое в почв., 5, 15.
Тимурджи Г. К., 1939. Влияние t° и влажности почвы на жизнедеятельность клубеньковых бактерий при инокуляции нута. Сб. н-и работ Азово-Черноморского ин-та, т. II, стр. 75.
Тимурджи Г. К., 1939. Влияние различных рас клубеньковых бактерий на степень заражения и урожай различных сортов бобовых. Сб. н-и работ Азово-Черноморского сельск. х. ин-та, 7, 37—52.
Турчин Ф. В., Берсенева З. Н., Плышевская Е. Г., Зерцалов В. В., 1958. Изучение биологической фиксации атмосферного азота в клубеньках бобовых растений с применением изотопа N15. Сб. Физиол. раст. агрохимия, почвоведение, Изл-во АН СССР, М., 148—157.
Тюрин И. В., 1954. Повышение плодородия и культурного состояния почв СССР — важнейшая проблема почвоведения и земледелия. Почвоведение, 3.
Украинский В. Т., 1954. Клубеньковые бактерии на корнях бобовых растений. Микробиология, 23, 3, 291.

Урбах В. Ю., 1963. Математическая статистика для биологов и медиков. Изд-во АН СССР, М.

Успенская Т. А., 1953. Азотфиксирующая активность клубеньковых бактерий в клубеньках гороха и сои при различной продолжительности и интенсивности освещения растений и в чистых культурах. Диссертация, фонд, ТСХА.

Федоров М. В., 1944. Влияние корневых выделений кукурузы на фиксацию азота атмосферы азотобактером в условиях монобактериальной культуры. Микробиология, 13, 5, 199—210.

Федоров М. В., 1951. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.

Федоров М. В., 1952. О механизме фиксации молекулярного азота клубеньковыми бактериями. Тр. Ин-та микробиол. АН СССР, 2, 78—88.

Федоров М. В., 1963. Микробиология. Изд-во с.-х. Л., М.

Федоров М. В., Ласло Д., 1956. Азотфиксирующая активность клубеньковых бактерий гороха и вики в клубеньках в разные фазы развития бобового растения. Изв. ТСХА, 2, 61—82.

Федоров М. В., Ницэ Л., 1961. Физиологические различия между штаммами клубеньковых бактерий гороха и вики, обладающих разной азотфиксирующей активностью. Микробиология, 30, 3, 473—477.

Федоров М. В., Подъяпольская В. В., 1950. Влияние обеспеченности среды фосфором и калием на образование клубеньков у бобовых. Докл. АН СССР, 77, 5, 1081—1084.

Фихман Б. А., 1957. К проблеме получения стабильных оптических стандартов (эталонов мутности) для определения содержания микробных тел в микробных взвесях. Тез. докл. научн. конф. ГКИ им. Тарасевича, М.

Фихман Б. А., 1958. Значение «Оптического эффекта» физических и химических воздействий на бактерийные взвеси при стандартизации вакции. Тезисы докл. науч. конф. ГКИ им. Тарасевича, М.

Фихман Б. А., 1959. Принцип иммерсионной микрорефрактометрии для прямого определения живых и мертвых клеток бактерий. Докл. АН СССР, 124, 5.

Фихман Б. А., 1960. Оптическая стандартизация бактерийных препаратов. М.

Юхимчук Ф. Ф., Бураков Я., Гусев Н., Харламов В., 1937. О новых приемах агротехники клевера на семена. Хим. соц. зем., 8.

Цюрупа В. Н., 1936. Действие нитрагина на урожай сои при различных условиях культуры. Сб. работ Азово-Черноморск. с.-х. ин-та, 4, 42.

Чайлахян М. Х., Меграбян А. А., 1945. Влияние растворимых азотистых соединений на образование клубеньков на корнях бобового растения. Докл. АН СССР, 48, 154—148.

Швецова О. И., 1931. Исследования над клубеньковыми бактериями. Опыты по заражению клубеньковыми бактериями сои в Среднем Поволжье. Тр. Всес. ин-та микробиологии, 4, 3, 111—122.

Шевчук В. Е., 1962. Инокуляция бобовых растений и биологическая фиксация азота атмосферы. Изв. Иркутского с.-х. ин-та, 19, 2, 343—369.

Шестакова А. Г., 1940. Влияние бора, марганца, железа и алюминия на рост гороха и других культур. Тр. Московск. с.-х. акад. им. Тимирязева, 5, 1, 22.

SISUKORD

Sissejuhatus 3

I. Kirjanduse ülevaade 7

1. Liblikõieliste taimede ja nendel esinevate mügarate iseloomustus 7
   Alamsugukond *Mimosoideae* 7
   Alamsugukond *Caesalpinioideae* 9
   Alamsugukond *Swartzioideae* 10
   Alamsugukond *Papilionoideae* 10
2. Mügarbakterite iseloomustus 12
   Morfoloogilised tunnused 13
   Füsioloogilised tunnused 18
   Biokeemilised tunnused 20
3. Mügarbakterite klassifikatsioon 22
4. Mügarbakterite levikut mõjustavad tegurid 26
   Mügarbakterite esinemine muldades 26
   Füüsilised ja keemilised faktorid 27
   Toitumisfaktorid 30
5. Liblikõieliste ja mügarbakterite vaheline sümbioos 35

II. Eksperimentaalosa 40

1. Mügarate esinemine ja morfoloogia Eestis kasvavatel liblikõielistel 40
   Metoodika 41
   Uurimistulemused 43
   Kokkuvõte 56
2. Mügarbakterite morfoloogilised, füsioloogilised ja biokeemilised omadused . . . 17
   Metoodika 58
   Uurimistulemused 60
   Mügarbakterite kasv erinevatel söötmetel želatiinis ja lakmuspiimas 60
   Hapete moodustumine süsivesikute fermenteerimisel *Rhizobium*'i poolt 95
   Kokkuvõte 95

3. Mügarbakterite sümbioos liblikõieliste taimedega Eesti NSV-s 98
Metoodika 100
Mügarbakterite tiitri nefelomeetriline määramismeetod 101
Uurimistulemused 104
Kokkuvõte 132

III. Katsetulemuste arutelu 134

Järeldused 139

Ingliskeelne resümee 142

Venekeelne resümee 159

Kirjanduse loetelu 177

Trükivigu

Vea asukoht	On trükitud	Peab olema
Lk. 81 joonis 13 Lk. 117 joonis 21, lk. 118 joonis 22, lk. 120 joonis 23, lk. 122 joonis 25, lk. 126 joonis 26, lk. 128 joonis 27	*Lathyrus palustre*	*Lathyrus palustris*
Lk. 152 alt 6. rida	*Lathyrus pratense* cells	*Lathyrus pratensis* celles

Tell. nr. 1135.

Э. Пярсим. КЛУБЕНЬКОВЫЕ БАКТЕРИИ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ В ЭСТОНСКОЙ ССР. На эстонском языке. Художественное оформление У. Кюльв. Издательство «Валгус», Таллин, Пярнуское шоссе, 10.

Toimetaja A. Kruus. Kunstiline toimetaja R. Tungla. Tehniline toimetaja I. Vahtre. Korrektor E. Bitter. Laduda antud 12. II 1969. Trükkida antud 25. IX 1969. Läti NSV Staicele Paberivabriku trükipaber nr 1, 70 × 90/16. Trükipoognaid 12 + 10 lisa. Tingtrükipoognaid 14,77. Arvestuspoognaid 14,95. Trükiarv 800. MB-08566. Tellimuse nr. 1135. Hans Heidemanni nim. trükikoda, Tartu, Ülikooli 17/19. II

Hind rbl. 1.24

A-30256

Rbl. 1.24