

Selectie van *Rhizobium*-stammen ter verbetering van de entstof voor vlinderbloemigen

G. W. HARMSSEN

Vlinderbloemige planten kunnen luchtstikstof alleen in symbiose met wortelknolletjesbacteriën (*Rhizobia*) binden en zijn dus alleen bij het tot stand komen van deze symbiose onafhankelijk van de beschikbaarheid van stikstof in de grond. Als regel is het niet nodig deze gewassen met *Rhizobium*-cultures te enten, daar meestal de vereiste organismen in voldoende aantal in de grond aanwezig zijn. Dit geldt echter alleen voor gronden en klimaatsomstandigheden die niet te ongunstig zijn voor het saprofytisch voortbestaan van de wortelknolletjesbacteriën in tijden wanneer het desbetreffende vlinderbloemige gewas niet aanwezig is. Er zijn talrijke gevallen bekend geworden, waarin op te zure of onvoldoende ontwaterde gronden de *Rhizobia* niet of niet in voldoende aantal aanwezig zijn. In extreme gevallen zal ook een kunstmatige enting geen succes hebben, daar de toegevoegde bacteriën terstond weer afsterven of althans de symbiose niet tot stand komt. In grensgevallen echter kan door enting het aantal tijdelijk zodanig worden verhoogd, dat een voldoende aantal werkzame wortelknolletjes wordt gevormd. Zo zijn er gevallen waarin door enting soms eclatante successen worden geboekt, bijv. in zure veenkoloniale gronden met klaver.

Niet altijd gaat het om een onvoldoende aantal wortelknolletjesbacteriën in de grond. Soms moet de oorzaak worden gezocht in een te geringe werkzaamheid of zelfs een algehele onwerkzaamheid der aanwezige *Rhizobia*. Ook hierbij kan soms door enting met een efficiënte stam een aanmerkelijke verbetering tot stand worden gebracht; deze moet echter succesvol met de slechtere natieve stammen kunnen concurreren. Dat een ongunstige bodem- en/of klimaatstoestand niet alleen gepaard gaat met een te gering aantal wortelknolletjesbacteriën doch tevens met het prevaleren van minder efficiënte stammen, is duidelijk aangetoond door Thornton (1) voor Groot-Britannië, waar op de zure gronden in het ruwe, regenrijke klimaat op de hellingen der bergen in Wales en Schotland meestal onwerkzame of onvoldoende werkzame stammen der klaver-*Rhizobia* werden aangetroffen, in tegenstelling tot de gunstigere streken in zuid- en oost-Engeland. Ook in ons land bleken bij een onderzoek van Harmsen & Wieringa (2) in de zure, slecht ontwaterde laagveengronden in het zgn. 'Lage Midden' van Friesland en in de stugge komgronden tussen de beneden rivieren veel onwerkzame of inferieure stammen voor te komen.

In de gevallen van te zure of onvoldoende ontwaterde gronden kan men vaak veel bereiken door kunstmatige enting. Datzelfde geldt in haast nog sterkere mate voor op zichzelf gunstige gronden, die echter door hun voorgeschiedenis

niet voldoende kiemen van de vereiste *Rhizobium*-stammen bevatten. Zulke gevallen omvatten heide- en bosgrond-ontginningen en pas drooggelegde polders, zoals de Zuiderzeepolders. Het is in dergelijke gevallen niet noodzakelijk voor de enting de meest efficiënte stammen te gebruiken; ook met middelmatig efficiënte kan vaak een duidelijke verbetering tot stand worden gebracht. Anders wordt het echter, als men wil trachten ook op gunstige gronden — waar zelfs zonder enting een goede vorming van wortelknolletjes tot stand komt en het gewas niet zichtbaar door gebrek aan stikstof lijdt — door enting de stikstofbinding en daarmee de opbrengst te verhogen. Dan moet men over bijzonder efficiënte stammen beschikken, superieur aan de reeds zeer behoorlijke natieve stammen die in dergelijke gronden aanwezig kunnen zijn.

Nog niet lang geleden heeft men ontdekt, dat er grote verschillen in efficiëntie bestaan tussen tot één 'cross-inoculation group' behorende *Rhizobium*-stammen. Löhnis (3) heeft pas in 1930 onwerkzame stammen ontdekt, die wel knolletjes op de wortels doen ontstaan, maar geen luchtstikstof binden. Daarna is de efficiëntie een der meest onderzochte problemen bij de bestudering van de *Rhizobium*/Leguminososen-symbiose geworden, waarbij deze differentiatie zich steeds meer over de grenzen van de oorspronkelijk als vaststaand beschouwde groepen van stammen ('cross-inoculation groups') heeft uitgestrekt. Nu weet men dat er in de meeste dezer groepen wijde variaties in efficiëntie voorkomen van maximaal werkzaam tot volstrekt onwerkzaam, dus parasitair. Ook is bekend dat deze verschillen in efficiëntie op hun beurt weer afhankelijk zijn van de soort der tot de groep behorende vlinderbloemigen, doch soms ook van variëteiten of rassen binnen één soort.

Het is niet de bedoeling hier nader op dit ingewikkelde en nog steeds groeiende gebied van onderzoek in te gaan. Een praktische consequentie is echter, dat men overal is gaan zoeken naar de gunstigste combinatie van *Rhizobium*-stammen en soorten en rassen van de vlinderbloemige gewassen. Men ontdekte al spoedig dat niet alleen onder ongunstige omstandigheden de in de grond aanwezige stammen niet de meest werkzame zijn, doch dat ook in goede gronden de natieve stammen vaak enigszins achterstaan bij de beste geïsoleerde stammen, die in cultuurcollecties worden bewaard. Het pionierswerk in dit onderzoek werd verricht in de Verenigde Staten, Engeland, Zweden en Duitsland, waar men reeds vóór de laatste wereldoorlog over geselecteerde stammen beschikte, die bij vergelijkende proeven bijzonder gunstige resultaten hadden opgeleverd. Die stammen worden daar dan ook als entstof gebruikt en men is er ver gevorderd in de selectie van aparte superieure stammen voor verschillende rassen van de belangrijkste vlinderbloemige gewassen, alsmede voor de verschillende grondsoorten en klimaten. Gebleken is immers, dat onder uiteenlopende uitwendige omstandigheden verschillende stammen het meest efficiënt blijken te zijn. Duidelijk kwam dit uit bij het beproeven van de beroemde stam S 22 van luzernewortelknolletjesbacterie, die door Manil in Gembloux in België was geïsoleerd en op de kalkhoudende gronden der Ardennen boven alle andere stammen uitblonk. In onze vergelijkende veldproeven bleek deze stam echter verreweg de slechtste resultaten op te leveren.

TOESTAND IN ONS LAND EN PLANNEN TER VERBETERING

In ons land had men tot 1952 nagenoeg geen pogingen ondernomen uitblinkende *Rhizobium*-stammen op te sporen en te isoleren. Er was dus sprake van een achterstand op dit gebied, welke zich des te sterker deed gelden, omdat in die jaren de enting van luzerne in Limburg met de door het Bedrijfslaboratorium geleverde entstof tot teleurstellende resultaten leidde, zodat men aan de waarde daarvan was gaan twijfelen. Toch bestond deze uit een mengsel van stammen, die bij controle werkzaam bleken te zijn. Indachtig de in het buitenland opgedane ervaring, dat in elk land en vaak zelfs in elke streek andere stammen de beste blijken te zijn, kon men op de in het buitenland verkrijgbare superieure stammen niet vertrouwen en moest in ons land opnieuw tot het selecteren van uitblinkende stammen overgaan.

Het is duidelijk dat men meer kans heeft bijzonder efficiënte stammen te vinden, naarmate men van een groter aantal stammen uitgaat. Het was dus zaak uit allerlei cultuurcollecties in binnen- en buitenland zo veel mogelijk stammen te verkrijgen, maar nog belangrijker werd het geacht een groot aantal stammen uit alle delen van ons land uit de knolletjes der gewassen te isoleren en aan een vergelijking te onderwerpen.

Gezien dit ruim opgezette programma was het duidelijk dat het project veel werk, tijd en kosten zou eisen. Gezocht werd dus naar een taakverdeling tussen voor dit werk in aanmerking komende instituten. Na overleg werd besloten, dat het Laboratorium voor Microbiologie van de Landbouwhogeschool de lupine/serradella-groep en daarna ook erwten en bonen voor zijn rekening zou nemen, terwijl het Instituut voor Bodemvruchtbaarheid de klaver- en de luzerne-hopperups-groepen zou bewerken. Later is de *Pisum/Vicia*-groep ook aan dit instituut in bewerking genomen. Aan de *Phaseolus*-groep is echter nog nauwelijks aandacht geschonken. Voor het bij de Landbouwhogeschool verrichte onderzoek zij verwezen naar het in 1960 verschenen rapport van Van Hiele (4), dat echter alleen de veldproeven, dus het laatste deel van de selectie, behandelt. In het onderstaande zal een kort overzicht worden gegeven van het werk bij het Instituut voor Bodemvruchtbaarheid. Voor een uitvoerige documentatie moet worden verwezen naar het rapport, waarin alle verkregen uitkomsten samengevat zijn (5).

OPZET VAN HET ONDERZOEK EN GEVOLGDE METHODEN

Daar van zo veel mogelijk stammen bij de selectie moest worden uitgegaan, was het niet doenlijk deze alle ineens in veldproeven te vergelijken. Men was dus genoodzaakt de vergelijking in enkele trappen te doen verlopen. Bij de eerste trap werden alle beschikbare stammen gebruikt voor het enten van uitwendig gesteriliseerd zaad, dat op een stikstofvrije agar-voedingsbodem in reageerbuisen (bij grootzadige planten in grotere buizen) werd gezaaid. De plantjes ontwikkelden zich voorspoedig, als voor juiste temperatuur en belichting werd gezorgd. Na verloop van 3 à 4 maanden vulden de plantjes de gehele buis en de voedingsbodem raakte uitgeput. Dan werd van de gehele inhoud van de buis, dus plant én voedingsbodem, volgens de Kjeldahl-methode

het totale stikstofgehalte bepaald. Door van de zo bepaalde hoeveelheid stikstof die uit het zaadje, de entstof en de voedingsbodem (die nooit volkomen stikstofvrij was) af te trekken, verkreeg men de door het plantje gebonden luchtstikstof. Deze grootte werd geacht het belangrijkste criterium te zijn voor de eerste selectie der cultures, aangezien het ondoenlijk is alle belangrijke eigenschappen, zoals stikstofbindingsvermogen, concurrentievermogen tegenover andere (natieve) *Rhizobium*-stammen en tegenover andere microben, resistentie tegen ongunstige bodem- en klimaatsfactoren etc., tegelijk bij de eerste toets te beoordelen. Daar het vermogen tot binding van luchtstikstof de basis is van het nut der symbiose, werd besloten de eerste beperking van het aantal te onderzoeken stammen door te voeren aan de hand van deze toets. Hoe noodzakelijk het was de eerste 'screening' der beschikbare stammen uit te voeren met een methode, die betrekkelijk eenvoudig en snel is en weinig ruimte in beslag neemt, blijkt, als men het aantal der te toetsen stammen overziet. Bij het bijeenbrengen van de series *Rhizobium*-stammen die in onderzoek werden genomen, moet men onderscheiden de stammen, die uit bestaande collecties in binnen- en buitenland werden betrokken, en de eigen isolaties. Het aantal van elders betrokken stammen viel tegen, daar nergens grote collecties worden aangehouden, doch alleen stammen die om bepaalde redenen van belang zijn. Bovendien vroegen wij steeds alleen om efficiënte stammen, zodat slechts een deel der aanwezige stammen voor ons werk in aanmerking kwam, terwijl tenslotte in alle collecties een groot deel der stammen geïnfecteerd of gedegeneerd bleek te zijn. De aantallen bruikbare stammen uit alle aangeschreven collecties waren dan ook teleurstellend. Na een vooronderzoek behield men voor de klavergroep (*R. trifolii*) slechts 12 stammen uit vreemde collecties, voor de luzerne/hopperups-groep (*R. meliloti*) 18 en voor de *Pisum/Vicia*-groep (*R. leguminosarum*) 17 stammen. Het aantal eigen isolaties (daaronder de reeds jaren geleden door Gerretsen aan het Instituut voor Bodemvruchtbaarheid en de door schrijver dezes in Medemblik en Kampen gewonnen stammen, alsmede de tijdens dit onderzoek verzamelde) was echter veel groter: 137 voor *R. trifolii*, 189 voor *R. meliloti* en 120 voor *R. leguminosarum*.

Bij voorproeven was gebleken dat bij de toets in agar-buisjes de variatie tussen de herhalingen vrij groot kan zijn. Daarom moest de proef in tienvoud worden uitgevoerd. Zodoende omvatte de eerste toets zeer grote aantallen buisjes met als consequentie een even groot aantal Kjeldahl-bepalingen. Voor de klavergroep bijv. ging het om $137 + 12 = 149$ stammen, dus 1490 buisjes met daarnaast nog ongeënte buisjes als blanco-object en met stikstof bemeste, ongeënte buisjes ter vergelijking. Om de reproduceerbaarheid van de bepaling te toetsen werd de gehele serie twee maal uitgevoerd, waarbij geen grote afwijkingen werden opgemerkt. Zo kwam men alleen voor de klavergroep al tot meer dan 3000 buisjes en stikstofbepalingen.

Na in deze primaire toets het aantal stammen tot een hanteerbare grootte te hebben teruggebracht, werd met aan de natuurlijke omstandigheden beter aangepaste methoden de waarde der stammen nader onderzocht, waarbij de

andere, bijkomende, eigenschappen in het werk werden betrokken. De volgende stap was de kweek in schoon kwartszand, waarbij alleen het wortelstelsel steriel werd gehouden door afdekking met steriel gearaffineerd zand. De bovengrondse delen konden zich vrij in de lucht ontwikkelen. Deze werkwijze is in principe ontwikkeld door Gerretsen (6), maar werd nu in een enigszins vereenvoudigde uitvoering toegepast. Ze beantwoordde volkomen aan de verwachtingen, daar in de ongeënte potjes zich slechts bij hoge uitzondering een enkel knolletje vormde, terwijl de proeven soms 3 à 4 maanden duurden. Men gebruikte hierbij glazen jampotten.

Bij deze proeven, waarbij alleen de tijdens de selectie in agar-buizen uitgezochte ca. 25 beste stammen werden gebruikt, werden verschillende soorten en rassen van vlinderbloemigen toegepast, waarmede de uit de literatuur bekende specifieke aanpassing van bepaalde stammen aan bepaalde planten in de vergelijking werd ingevoerd. Bij de klavergroep werden enkele rassen van rode en van witte klaver beproefd. Bij de luzernegroep werden zowel enkele echte luzernes als ook bastaard-luzernes en hopperups-rassen gebruikt. De *R. leguminosarum*-groep tenslotte werd op enkele rassen van erwten, wikken en *Vicia*-bonen beproefd. Soms werd in deze toets reeds naast het inerte kwartszand ook een natuurlijk duinzand toegepast, dat een geringe hoeveelheid stikstof bevatte.

Deze steriele test werd verder gevolgd door het kweken van de gewassen in niet gesteriliseerde grond in gewone Mitscherlich-cultuurpotten, waardoor het concurrentievermogen der stammen tegenover de natieve *Rhizobia* en tegenover alle andere micro-organismen in de grond werd getoetst. Hierbij beperkte men zich nog meer en gebruikte alleen de ca. 10 stammen in elke groep, die bij de steriele proeven met kwartszand als de beste voor de dag waren gekomen. Een tweede toetspunt bij deze vergelijking was de toepassing van verschillende grondsoorten.

Hoewel bij de vergelijking in Mitscherlich-potten de belangrijkste zich in de praktijk voordoende variaties in de omstandigheden werden verwezenlijkt, werd het niet verantwoord geacht de praktijk-toets met veldproeven weg te laten. Deze, op verschillende grondsoorten gelegen, proeven werden zo zorgvuldig mogelijk uitgevoerd, waarbij alle besmetting van het ene veldje door entingen van aangrenzende veldjes werd voorkomen door speciale maatregelen, zoals niet over reeds geënte veldjes lopen, ontsmetten van de gereedschappen bij overgang van de ene cultuur naar een andere, e.d. Achteraf bleek deze voorzichtigheid overdreven te zijn, daar dergelijke incidentele besmettingen nauwelijks tot uiting kwamen. Dezelfde ervaring werd ook door Van Hiele opgedaan (4). Terwijl bij de agar-toets en die in zand en in Mitscherlich-potten als regel in tienvoud werd gewerkt, kon dat in de veldproeven niet worden volgehouden. Men moest zich vergenoegen met 3 à 4-voudige herhalingen.

UITKOMSTEN

Voor een volledige weergave van de proeven moet wederom worden ver-

wezen naar het rapport (5). Hier kunnen alleen enkele der voornaamste uitkomsten worden vermeld.

Reeds de eerste toets in agar-buizen leverde interessante uitkomsten op en maakte het mogelijk een voorlopige selectie door te voeren en ca. 25 stammen voor verdere beproeving aan te wijzen.

Bij het bewerken van de klavergroep is allereerst gebleken dat zelfs na de uitsluiting der zeer slechte stammen bij de voorproeven er nog sprekende verschillen tussen de vergeleken stammen werden gevonden. De minst efficiënte stam (no. 41) had per buisje (in elk buisje maar één plantje) gemiddeld slechts 0,27 mg stikstof gebonden, variërend van 0,04 tot 0,50 mg, de beste stam (no. K8) echter gemiddeld 0,84 mg, variërend van 0,54 tot 1,26 mg. Onder de tevoren uitgeschakelde stammen kwamen vele volkomen onwerkzame of slecht werkende voor.

Aan de top stonden enkele stammen die bij beide herhalingen van de proef als de meest efficiënte voor de dag kwamen, t.w. K8, K40, K9 en Clover C1, met resp. 0,84; 0,75; 0,72 en 0,71 mg gebonden stikstof per buisje. Deze onderlinge verschillen zijn echter niet of nauwelijks significant. De drie tot de K-serie behorende waren alle eigen isolaties, de stam Clover C1 was afkomstig uit Rothamsted. Voor het verdere onderzoek werden niet alleen deze vier meest werkzame stammen gebruikt, doch alle stammen met een stikstofbinding van 0,55 mg of hoger. 21 der onderzochte stammen beantwoordden hieraan. Opvallend was ook, dat naast stammen met een kleine spreiding tussen de herhalingen andere voorkwamen, die bij de toets in agar-buizen steeds een sterk uiteenlopende binding van stikstof gaven te zien. De standaardafwijkingen waren bij enkele (niet altijd bij de gemiddeld beste) stammen kleiner dan 7 % van het gemiddelde, bij andere echter meer dan 25 %. De oorzaak van deze ongelijkmatigheid tussen de buisjes is nog niet gevonden. In de meer natuurlijke media, zand of grond, handhaafde zich dit verschil tussen de stammen.

Op overeenkomstige wijze als de klavergroep werd ook de luzerne/hopperups-groep bewerkt, waarbij een iets gewijzigde voedingsbodem werd gebruikt (o.a. pH \pm 7.5 in plaats van \pm 6.0). Afgezien van enkele minder werkzame stammen was de variatie van de stikstofbinding in deze groep geringer dan in de *R. trifolii*-groep. Terwijl in de laatstgenoemde naast een meerderheid van slechte tot matige stammen een relatief klein aantal goede stammen voorkwam, bleken bij de *R. meliloti*-groep naast slechts enkele minder goede stammen de meeste goed tot zeer goede te zijn, met geringe onderlinge verschillen. Ca. 75 % van de 207 getoetste stammen behoorde tot de goede stammen, met gemiddelde stikstofbinding per buisje variërend van 1,37 tot 1,05 mg. De voor verder onderzoek gekozen 25 beste stammen verschilden niet significant van de daarop volgende. Een zekere willekeur kan aan deze keuze dan ook niet worden ontzegd.

Dat geldt in nog sterkere mate voor het reeds in dit stadium aanwijzen van de vermoedelijk meest werkzame stammen. Het meest efficiënt leken te zijn de nummers K24, G39, G42, Lim 8, Lim 9 en Lim 7, alle eigen isolaties

van Gerretsen of van schrijver dezes. Zij weken echter niet significant af van de overige der 25 gekozen stammen. Opvallend was, dat onder de *R. meliloti*-stammen geen enkele volkomen onwerkzame werd aangetroffen, terwijl zij vrij talrijk waren in de *R. trifolii*-groep.

Ook de *Pisum/Vicia*-groep werd op analoge wijze onderzocht, waarbij wikken het meest geschikte toetsgewas bleek te zijn. Het meest opvallende resultaat was, dat in deze groep een zeer groot aantal onwerkzame of slechts zwak werkzame stammen voorkwam. Zelfs isolaties verkregen uit ogenschijnlijk normale, goed ontwikkelde knolletjes op welig groeiende planten bleken soms inferieure stammen te zijn. Binnen de groep der efficiënte stammen trof men ook nog duidelijke verschillen aan, zodat men tenslotte slechts 16 stammen overhield met meer dan 7 mg gebonden stikstof per plantje, variërend tussen 7,1 en 15,2 mg, waarmede verder werd gewerkt. De stammen nrs. 4, 6, 15, 22, 23 en 26 leken de beste te zijn.

De volgende trap van de vergelijking, nl. die in steriele zandcultuur, heeft in grote lijnen een bevestiging van de proeven in agar-buizen opgeleverd. Bij de klavergroep bleken drie der daarbij als beste gekwalificeerde stammen, K8, K9 en Clover C1, ook hier weer tot de beste te behoren. Alleen stam K40 bleek nu bij 44 achter te staan. De verschillen in gradatie van aanpassing aan de zes klaverrassen, waarop de proef was uitgevoerd, bleken relatief gering en nauwelijks significant. Voor het verdere onderzoek in niet steriele gronden werden slechts vijf stammen gebruikt, nl. K8, K9, 44, Clover C1 en K40.

Ook bij de luzerne/hopperups-groep leverde de steriele toets in zand vrijwel een bevestiging van die in agar op. Nu vielen van de beste zes stammen de nrs. K24, G39, Lim 8 en Lim 7 wederom in de groep der beste. Alleen G42 en Lim 9 werden verdrongen door 1Gr en Lim 2, maar evenals bij de agar-proef waren de verschillen tussen deze stammen niet significant. Voor een nadere vergelijking werden alleen de stammen K24, G39, Lim 8, Lim 7 en 1Gr gebruikt.

Een nog betere overeenkomst tussen de uitkomsten van de agar-proef en die in steriel zand vond men bij de *Pisum/Vicia*-groep, waar alleen stam 26 van de vermoedelijk beste moest worden vervangen door 18. Daar deze proef alleen op Negro-wikken werd uitgevoerd, verkreeg men geen inzicht in de specifieke aanpassing aan bepaalde gewassen. Voor verder onderzoek werden alleen de stammen 4, 6, 15, 22 en 26 gebruikt.

Van de proeven in Mitscherlich-potten met natuurlijke, niet gesteriliseerde gronden zal korthedshalve alleen de klavergroep worden besproken en alleen één van de drie series bij wijze van voorbeeld nader worden vermeld. Deze serie werd uitgevoerd op twee gronden: een calciumcarbonaat-houdende, mariene zavel en een zure, humeuze, diluviale zandgrond met een pH van 4,6. Drie rassen rode klaver (Rozendaalse, Groninger en Pajbjerg) en drie rassen witte klaver (cultuurklaver C.B., weideklaver C.B. en Deense) werden gebruikt. Geënt werd met de bij de steriele zandproef gekozen beste vijf stammen: 44, K8, K9, K40 en Clover C1.

Op de kalkhoudende zavel ontwikkelden alle gewassen zich voorspoedig, zonder dat merkbare verschillen in stand zichtbaar werden. Ook bij de oogst en de analyse der plantjes werden slechts geringe, niet significante verschillen waargenomen. Ook ongeënte potten weken niet af van de geënte en bleken een uitstekende beknolling te hebben. In deze grond bestond de natieve populatie der *Rhizobia* blijkbaar uit zo goede stammen, dat geen der gebruikte stammen een verbetering kon teweegbrengen.

Tabel 1 Verloop van de groei van de *Rhizobium*-populaties en de stikstofbinding op zure zandgronden bij geënte en niet-geënte objecten

Object en entstof	Droge stof * (g/pot)	N-gehalte (%)	Totaal-N ** (mg/pot)	Gebonden N *** (mg/pot)	Rangorde der stammen ****
<i>Rozendaalse rode klaver</i>					
ongeënt	8,45	2,34	189	—	—
44	9,4	2,58	243	45	5
K8	17,8	2,83	504	306	1
K9	12,1	2,88	348	150	3
K40	11,8	2,54	300	102	4
Clover Cl	15,0	2,94	441	243	2
<i>Groninger rode klaver</i>					
ongeënt	6,7	2,03	136	—	—
K8	12,9	2,74	354	218	1
K40	9,35	2,40	224	88	2
<i>Pajbjerg rode klaver</i>					
ongeënt	7,6	1,87	142	—	—
K8	15,5	3,04	471	329	1
K40	8,0	2,52	202	60	2
<i>Witte cultuurklaver C.B.</i>					
ongeënt	8,3	2,18	181	—	—
44	8,6	1,90	163	-17	5
K8	13,4	3,01	404	223	1
K9	10,3	2,64	272	91	2
K40	9,6	2,31	222	41	4
Clover Cl	9,35	2,60	243	62	3
<i>Witte weideklaver C.B.</i>					
ongeënt	10,4	2,24	233	—	—
K8	15,6	3,12	486	253	1
K40	10,1	2,29	231	-2	2
<i>Deense witte klaver</i>					
ongeënt	10,9	2,29	250	—	—
K8	17,8	3,32	591	341	1
K40	11,7	2,56	300	50	2

* Totaal van bovengrondse delen en wortels.

** In de gehele planten (boven- en ondergronds).

*** Na aftrek van de stikstof in de ongeënte objecten.

**** Ten opzichte van de stikstofbinding.

Op zure zandgrond was de groei echter aanzienlijk slechter en deed zich aanvankelijk bij alle objecten een stagnatie met verschijnselen van stikstofgebrek voor. Spoedig trad echter overal herstel op, dus ook bij niet enten, doch hier ontwikkelden zich sprekende verschillen, die ook bij de oogst en de analyse tot uiting kwamen, zoals is af te leiden uit tabel 1.

Uit deze cijfers kan het volgende worden afgeleid:

1. In de zure grond zijn native *Rhizobia* aanwezig, die de klaver in staat stellen stikstof te binden, maar hun aantal of efficiëntie is niet voldoende voor een behoorlijke ontwikkeling van de klaver. In de kalkhoudende zavel werd gemiddeld ca. 800 mg stikstof per pot in de planten gevonden, dus meer dan in de beste potten in de zure grond.
2. Er treden grote en zeer betrouwbare verschillen tussen de gebruikte stammen op. Gemiddeld over alle zes klaverrassen bleek de stam K8 ver boven de andere uit te steken, terwijl vermoedelijk Clover C1 op de tweede en K9 op de derde plaats stonden, gevolgd door K40 op de vierde plaats. Bij herhaling van de proef met andere combinaties van rassen en grondsoorten werd deze rangorde bevestigd.
3. Enige specialisatie van bepaalde *Rhizobium*-stammen op bepaalde klaverrassen tekende zich af. De verschillen waren echter niet groot. Bij de herhaling der proeven was deze specialisatie nog minder duidelijk, zodat zij binnen de beproefde stammen en rassen van geen praktische betekenis bleek te zijn.
4. De bijzonder waardevolle eigenschappen van stam K8 berusten niet op een uitzonderlijk hoge stikstofbinding, doch op het vermogen zich in zuur milieu te ontwikkelen en daarbij met succes met de autochtone stammen te concurreren.

Op analoge wijze werden de luzerne/hopperups-*Rhizobia* in proeven met Mitscherlich-potten vergeleken op verschillende luzerne- en hopperupsrassen en op verschillende gronden. Evenals bij de toets in steriel zand, bleken ook nu weer de verschillen tussen de beste vijf stammen (K24, G39, Lim 7, Lim 8 en IGr) gering en nauwelijks betrouwbaar te zijn. Op niet zure zand- en kleigronden uitten zich deze verschillen dan ook niet, maar op de zwak zure (pH-KCl 6,1) zandgrond van het zuidelijk diluvium (de zgn. 'Veldgrond' uit de buurt van Venray) kwamen wel enkele verschillen tot uiting: de stam Lim 8 bleek daar geen knolletjes te vormen, noch op Du Puits- noch op Grimm-luzerne; de andere stammen deden het wel, hoewel de groei en de stikstofbinding op deze grond bij alle entingen geringer waren dan op de zware gronden. Zodoende werden de stammen K24, G39, Lim 7 en IGr als de beste vier beschouwd, zonder duidelijke onderlinge verschillen. Zonder enting vormden zich op de zandgrond geen knolletjes, terwijl dat wel het geval was op de zware gronden. In tegenstelling tot de klavers die op niet zure gronden zonder enting even goed groeiden en stikstof bonden als na enting, was de groei van luzerne en hopperups ook op de beste gronden zonder enting aanzienlijk geringer (ca. 20 %) dan na enting.

Bij deze pottenproeven met de luzerne-*Rhizobia* werden ook de handelsentstoffen van het Bedrijfslaboratorium, van de Landbouwhogeschool in Uppsala en 'Nodosit' uit België opgenomen. De twee eerstgenoemde waren volkomen vergelijkbaar met de goede stammen, hetgeen ook verwacht mocht

worden nu er in deze groep zo weinig verschil tussen de goede stammen bleek te bestaan. 'Nodosit' was echter nauwelijks werkzaam.

De proef in Mitscherlich-potten met de stammen van *R. leguminosarum*, die op slechts een erwtenras (Rondo) op drie grondsoorten werd uitgevoerd, leverde wederom een geheel ander resultaat op. Het meest opvallend was het, dat hoge pH en kalkrijkdom hier gemiddeld geen gunstige factoren bleken te zijn. Sommige stammen reageerden gunstig op de hoge pH in de kalkrijke zware zavel (pH-KCl 7,1), vooral stam 26, maar ook 22 en de op het Microbiologisch Laboratorium der Landbouwhogeschool geïsoleerde stam F2. De stam 15 en een andere uit Wageningen ontvangen stam (Bos) bleken echter juist op de zwak zure, diluviale zandgrond (pH-KCl 5,1) het meest effectief te zijn. Zodoende werd stam 15 gekozen als speciaal geschikt voor zure gronden, terwijl voor andere gronden de stammen 4, 6, 22 en F2 als uitblinkers werden aangewezen.

Daar bij de pottenproeven in niet gesteriliseerde, natuurlijke gronden de *Rhizobium*-stammen reeds aan de meeste variabele invloeden (grondsoort, gewas/stam-relatie, weersgesteldheid) werden onderworpen, werd niet verwacht dat de eindfase van het onderzoek (de veldproeven) belangrijke nieuwe gezichtspunten zouden opleveren. Dat bleek ook inderdaad niet het geval te zijn: de bij de pottenproeven opgestelde rangorde der stammen kon nagenoeg ongewijzigd worden gehandhaafd. Het is dan ook niet noodzakelijk de veldproeven van dit gezichtspunt uit nader te schetsen, hetgeen ook ondoenlijk zou zijn gezien het vrij grote aantal der veldproeven, verspreid over het gehele land. Slechts bij wijze van illustratie kan de uitkomst van één der veldproeven met luzerne, nl. op kalkhoudende zavel bij Usquert, worden vermeld, waar naast de vijf bij de pottenproef gebezigde stammen ook enkele handelsentstoffen werden gebruikt. De verkregen resultaten zijn weergegeven in tabel 2).

Tabel 2 Vergelijking tussen vijf *Rhizobium*-stammen en enkele handels-entstoffen met betrekking tot hun effect op de groei, de beknolling en de opbrengst van luzerne

Entstof	Standcijfer *	Beknolling *	Droge-stofopbrengst eerste snede (100 kg/ha)
Ongeënt	6	2	34,7
K24	9½	8	49,8
G39	8½	7	47,5
Lim 7	9	7	47,2
Lim 8	9	9	47,9
lGr	8½	8	46,9
B.L.-entstof	9½	9	50,2
Uppsala-entstof	9	8	47,4
'Nodosit'	6	2	39,7

* Vlak voor de oogst van de eerste snede.

De verschillen tussen de vijf stammen en de handelsentstoffen BL en Uppsala bleken bij variantie-analyse niet significant te zijn; alleen op de ongeënte of op de met 'Nodosit' geënte veldjes waren groei, beknolling en opbrengst betrouwbaar slechter.

In al deze proeven werden dezelfde stammen onderzocht als in de proeven met Mitscherlich-potten. Door ongelijkmatigheden in de grond en de niet controleerbare invloeden van het weer was de spreiding der uitkomsten veel groter dan in de potproeven.

CONCLUSIES EN SAMENVATTING

Samenvattend kunnen uit het voorgaande de volgende conclusies worden getrokken:

1. Allereerst is het gebleken met de gebezigde werkwijze mogelijk te zijn stammen van wortelknolletjesbacteriën te isoleren, die betrouwbaar boven andere stammen uitsteken. Dat geldt vooral voor de klaver-groep (*R. trifolii*) en de *Pisum/Vicia*-groep (*R. leguminosarum*). Zodoende was dit onderzoek van grote waarde voor de landbouw.
2. Het in punt 1 gezegde komt het duidelijkst tot uiting bij vergelijking der stammen in steriel milieu, dus zonder concurrentie. Maar ook in natuurlijke omstandigheden in de grond zijn vaak sprekende verschillen tussen de stammen gevonden, vooral in minder gunstige gronden. In gunstige omstandigheden zijn de verschillen tussen de stammen soms gering en blijken de natieve *Rhizobia* in de ongeënte objecten even goed te werken, als de beste door enting toegevoegde.
3. Deze uitkomst der proeven sluit volkomen aan op de in ons land en in de meeste aangrenzende landen opgedane praktijkervaring, dat op goede gronden enting van klavers, wikken, *Vicia*-bonen en erwten geen waarneembare verhoging van de opbrengst met zich mede brengt. Alleen uit Zweden en Australië wordt bericht, dat enting van klavers en erwten daar nagenoeg altijd een aantoonbare oogstverhoging geeft.
4. De luzerne/hopperups-groep wijkt in zoverre van de klaver- en erwtenstammen af, dat zelfs de beste gronden als regel onvoldoende aantallen van deze *Rhizobia* bevatten, zodat enting ook in ons land meestal een merkbare oogstvermeerdering geeft. Daar echter de verschillen in effectiviteit tussen de goede stammen in deze groep gering zijn, is het gebruik van geselecteerde, superieure stammen op goede gronden van geringe betekenis. De selectie van stammen voor luzerne en hopperups is dus alleen op de minder gunstige gronden van grote betekenis.

SUMMARY

Selection of Rhizobium strains for improving the nitrogen fixation of legumes

The selection of *Rhizobium* strains, especially as regards their superior efficiency in competition with native strains and other microbes and their adaptability to unfavourable soil conditions was initiated in the United States, the United Kingdom, Sweden and Germany already before the war. In Holland such investigations were not started until 1952, when projects of this kind were included in the working schemes at the Agricultural University (Wageningen) and the Institute for Soil Fertility (Groningen). The latter part of this work is reported in this publication.

Starting for each cross-inoculation group with hundreds of strains collected from type-

culture collections or isolated in different parts of Holland, the most efficient strains were selected step by step. For the first screening the legumes were cultivated aseptically in a nitrogen-free agar medium. The next step was the use of sterile sand media, and in the following stage in the investigation pot experiments with natural unsterilized soils were performed. Finally, the value of the selected strains was also checked in field trials. The fixation of nitrogen was determined by analysis.

Following this procedure, some strains, significantly superior to the ordinary ones, were found in the clover group (*Rhizobium trifolii*) and in the *Pisum-Vicia* group (*R. leguminosarum*).

In the lucerne group (*R. meliloti*) no such marked differences could be detected, in spite of the fact that lucerne and black medic are stimulated by artificial inoculation on all soils, whereas in Holland it was only on the less fertile soils that clover and peas were stimulated by the selected superior strains.

The selected strains are now used for the production of the inoculum supplied to the farmers.

LITERATUUR / REFERENCES

- 1 Thornton, H. G.: Rothamsted Experimental Station, Harpenden, Report for the War Years 1939—1945, p. 74 (1946).
- 2 Harmsen, G. W. & Wieringa, K. T.: *Landbouwkundig Tijdschrift* 66 (1954) 531—533.
- 3 Löhnis, M. P.: *Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde II* 80 (1930) 342.
- 4 Hiele, F. J. H. van: Verslagen Landbouwk. Onderz. 66.19, Wageningen (PUDOC), 1960.
- 5 Harmsen, G. W.: Verslag betreffende de verbetering van de entstof voor vlinderbloemige gewassen. Intern rapport van het Instituut voor Bodemvruchtbaarheid (te verschijnen in 1966).
- 6 Gerretsen, F. C.: *Planta* 23 (1935) 593.