

KONKURENCJA SZCZEPÓW *Rhizobium* Z MIKROFLORĄ GLEBOWĄ O BRODAWKOWANIE ŁĘDŹWIANU SIEWNEGO (*Lathyrus sativus* L.)

Zbigniew Lorkiewicz¹, Edyta Kowalczyk¹, Szymon Dziamba²,
Aleksandra Górską-Melke¹, Mirosław Brzozowski¹, Jolanta Kołtun¹

¹ Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

² Katedra Szczegółowej Uprawy Roślin, Akademia Rolnicza w Lublinie

Wstęp

Problem biologicznego wiązania azotu stanowi przedmiot szczególnego zainteresowania wielu ośrodków naukowych. Przemysłowa produkcja nawozów azotowych wymaga dużych nakładów energetycznych i finansowych, a co najważniejsze – stwarza wiele poważnych problemów ekologicznych. Poszukiwania nowych możliwości wzbogacania gleby w azot zmierzają do wykorzystania układów symbiotycznych bakterii, tj. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* i *Sinorhizobium* z roślinami motylkowatymi, przez co można w ciągu roku dostarczyć od 20 do 700 kg N·ha⁻¹ gleby. Powszechnie stosowane są szczepionki bakteryjne dla poszczególnych roślin, oparte na wyslekcjonowanych szczepach *Rhizobium* o dużej efektywności i konkurencyjności względem endogennej mikroflory, które wypierają dzikie i nieefektywne w symbiozie szczepy glebowe [MARTENSSON, GUSTAFSSON 1985; THOMPSON 1991; BEATTI, HANDELSMAN 1993].

Łędźwian siewny (*Lathyrus sativus* L.), zwany również groszkiem siewnym [PODBIELKOWSKI Z. 1985], należący do roślin motylkowatych (*Papilionaceae*) plemienia wykowatych (*Viciae*), jest gatunkiem mało uprawianym na terenie Polski.

Rodzaj *Lathyrus* uprawiany jest od dawna w pld.-wsch. Azji, Płn. Afryce, Indiach, Iranie, Turcji i Ukrainie. W pld.-wsch. Polsce spotyka się w uprawach polowych łędźwian afrykański oraz łędźwian siewny, którego ojczyzną jest Azja Mniejsza. Nasiona łędźwianu siewnego są kanciaste o zróżnicowanej barwie brunatno-żółto-zielonkawej [DZIAMBA 1994], i charakteryzują się znaczną zawartością białka, węglowodanów i biopierwiastków [SZAFER i in. 1986; MILCZAK 1992; MILCZAK i in. 1993].

Zjawisko konkurencji (kompetycji) określane jest jako zdolność do zasiedlania przeważającej liczby brodawek przez jeden szczep w mieszanych zakażeniach, a także jego utrzymywanie się w glebie w kolejnych sezonach wegetacyjnych [DOWLING, BROUGHTON 1986; MAŁEK 1991; LORKIEWICZ 1994]. Szczepy dominu-

jące w zakażeniu, zaadaptowane do danych warunków glebowych, mogą służyć do produkcji szczepionek, jeśli będą także charakteryzowały się wysoką zdolnością do wiązania azotu [MARTENSSON, GUSTAFSSON 1985; DOWLING, BROUGHTON 1986]. Badania JENSENA i SORENSENA [1987] wykazały, że wyselekcjonowane w warunkach laboratoryjnych szczepy efektywne po wprowadzeniu do gleby, okazywały się niekonkurencyjne względem mało efektywnej mikroflory endogennej, lecz lepiej dostosowanej do lokalnych warunków glebowych.

Czynniki środowiskowe, tj. struktura gleby, pH, wilgotność, temperatura, zasolenie a także obecność pestycydów, herbicydów i różnych rodzajów upraw towarzyszących, są przyczyną naturalnej selekcji szczepów glebowych, a także bakterii obecnych w szczepionkach [MARTENSSON, GUSTAFSSON 1985; JENSEN, SORENSEN 1987].

Celem przeprowadzonych badań było określenie konkurencyjności i efektywności symbiotycznej szczepów *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* R6 i 10, na dwóch formach łądzianu siewnego – drobnonasiennego (populacja z odmiany Miłków) i grubonasiennego (populacja ze Słowacji).

Materiały i metody

Nasiona łądzianu siewnego (*Lathyrus sativus* L.) drobnonasiennego (populacja z odmiany Miłków) oraz grubonasiennego (populacja ze Słowacji), pochodziły z Katedry Szczegółowej Uprawy Roślin Akademii Rolniczej w Lublinie.

Szczepy *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* R6 i 10 zostały wyselekcjonowane w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej UMCS z kolekcji izolantów z brodawek bobiku odm. Nadwiślański na terenie Czesławic koło Lublina (szczep R6 był następnie koniugowany z *Azotobacter vinelandii*) i bobiku odm. Pikułowiecki z okolic Lwowa (szczep 10).

Fagi oznaczone symbolami 3H, 411, 412, 543, aktywne wobec szczepów *R. leguminosarum*, pochodziły z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Ogólnej UMCS w Lublinie.

Podłoża. W badaniach używano stałego i płynnego podłoża „79CA” [KOWALCZUK i in. 1995] do namnażania szczepów *Rhizobium*. Do kiełkowania nasion stosowano bezazotowy agar „R” [VINCENT 1970].

Nasiona sterylizowano za pomocą 0,1% $HgCl_2$ oraz 75% alkoholu etylowego. Nasiona zakażano szczepami *R. leguminosarum* bv. *viciae* R6 lub 10 oraz ich mieszankami w proporcjach 1:1, 1:10 i 10:1, sporządzanych w bezazotowym podłożu płynnym „R”, o gęstości 10^9 – 10^{10} komórek na cm^3 , a następnie wprowadzano do gleby.

W doświadczeniach probówkowych (o pojemności 300 ml) prowadzono hodowlę roślin na agarze „R”, nakładając pojedyncze siewki na skosy. Po wykształceniu się dwóch pierwszych listków, rozprowadzano w okolicy łodygi po 0,5 ml odpowiedniej zawiesiny *Rhizobium* lub płynnego podłoża „R” (kontrola).

Doświadczenia polowe przeprowadzano w Rolniczym Zakładzie Doświadczalnym AR w Felinie koło Lublina, metodą bloków zrandomizowanych w 4

powtórzeniach.

Siewu dokonywano ręcznie na mikropoletkach o pow. 1 m² i rozstawie 20 cm x 5 cm (100 nasion na m²). Pod koniec kwitnienia roślin pobierano z każdego poletka po 5 korzeni w celu izolacji bakterii z brodawek. Pozostałe rośliny do końca sierpnia pozostawiono na polu do osiągnięcia pełnej dojrzałości, a po omłóceniu liczono i ważono nasiona. Uzyskany plon nasion z 1 m² służył do ustalenia efektywności symbiozy.

Izolacja i identyfikacja *Rhizobium* z brodawek. Brodawki oddzielano od korzeni, po opłukaniu H₂O dest. zalewano 50% glicerolem i zamrażano w -20°C.

Szczepy użyte do zakażenia lędźwianu były wcześniej charakteryzowane pod względem oporności na streptomycynę oraz wrażliwości na 4 bakteriofagi (3H, 411, 412 i 543).

Szczep *R. leguminosarum* bv. *viciae* R6 cechował się opornością na 100 µg·ml⁻¹ streptomycyny i wrażliwością na w/w fagi, natomiast szczep *R. leguminosarum* bv. *viciae* 10 był wrażliwy na 10 µg·ml⁻¹ streptomycyny i oporny na cztery stosowane bakteriofagi.

Materiał pobrany z 20 brodawek roślin zakażanych (pojedynczymi szczepami, mieszanekami w różnych proporcjach lub kontrolnych nieszczepionych) rozsiewano na agarze „79CA”. Następnie po 10 pojedynczych koloniach z każdej brodawki sprawdzano pod względem zgodności cech antybiotykooporności i fagowrażliwości z inokulantami.

Łącznie przebadano ponad 2000 szczepów reisolantów, ustalając % zasiedlenia brodawek przez bakterie endogenne i obecne w szczepionce u dwóch odmian lędźwianu.

Wyniki i dyskusja

Wyniki przeprowadzonych badań mogą posłużyć do wyselekcjonowania w warunkach polowych i laboratoryjnych takich szczepów, które byłyby wysoce efektywne w symbiozie, a także konkurencyjne wobec mikroflory endogennej gleby, pod względem przystosowania do danych warunków środowiskowych [GŁOWACKA 1990].

Okazało się, że w badaniach próbkowych szczepy przez nas badane były infekcyjne dla obydwu odmian lędźwianu, natomiast ich zdolność do zakażenia w warunkach polowych, była niska lub całkowicie zahamowana. Świadczy to o restrykcyjnych dla szczepów *R. leguminosarum* bv. *viciae* R6 i 10 warunkach środowiskowych w glebie na terenie doświadczalnym w Felinie koło Lublina.

Podobnie JENSEN i SORENSEN [1987] obserwowali wpływ czynników środowiskowych na utrzymywanie się w glebie szczepów wprowadzonych przez inokulację.

Obserwując wschody roślin i obsadę roślin przed zbiorem stwierdzono, że lędźwian drobnonasienny i grubonasienny wykazywał wyższą obsadę roślin szczepionych (*R. leguminosarum* bv. *viciae* R6 oraz 10), w stosunku do kontroli (tab. 1).

Plony nasion odm. drobnonasiennej (kg·m⁻²) i masa nasion w g na roślinę tylko nieznacznie odbiegały od kontroli. Natomiast u lędźwianu odmiany grubonasiennej obsada roślin szczepionych była wyższa od kontroli średnio o 10%, a plony i masa nasion przewyższały kontrolę średnio o 13,0 i 18,6% (tab. 1).

Tabela 1; Table 1

Wschody roślin i plony nasion lędzwanu szczepionego
R. leguminosarum bv. *viciae* w doświadczeniu polowym
 Plant emergence and seed yields of chickling vetch inoculated with
R. leguminosarum bv. *viciae* in field experiments

<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Obsada roślin Plants density	Przed zbiorem Before harvest	Plon nasion Yield of seeds kg·m ⁻²	Masa nasion g na roślinę Weight of seeds g per plant
R6 : 10	szl.·m ⁻² no.·m ⁻²	% kontroli % control		
Lędzwan drobnonasienny; Chickling vetch small seeded				
1 : 1	78,5	114,9	0,57	7,35
1 : 10	75,8	111,0	0,57	7,66
10 : 1	70,5	103,2	0,51	7,32
1 : 0	76,0	111,3	0,53	7,11
0 : 1	74,0	108,3	0,51	6,98
Kontrola; Control	68,3	100,0	0,52	7,61
Lędzwan grubonasienny; Chickling vetch large seeded				
1 : 1	81,5	115,9	0,62	7,65
1 : 10	73,8	105,0	0,59	8,06
10 : 1	77,5	110,2	0,58	7,54
1 : 0	78,5	111,7	0,60	7,65
0 : 1	71,0	100,9	0,54	7,58
Kontrola; Control	70,3	100,0	0,52	6,49
NIR _{0,05} ; LSD _{0,05}	5,4	–	0,05	0,41

Tabela 2; Table 2

Efektywność i konkurencyjność szczepów *R. leguminosarum* bv. *viciae* R6 i 10
 Effectiveness and competitiveness of *R. leguminosarum* bv. *viciae* R6 and 10

<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> R6 : 10	Efektywność; Effectiveness		Kontekcja; Competition		
	plon nasion yield of seeds g·m ⁻² (%)	masa nasion g na roślinę mass of seeds g per plant (%)	% znakowanych reizolatów % of marked reisolatw		
			<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>		szczepy glebowe soil strains
			R6	10	
Lędzwan drobnonasienny; Chickling vetch small seeded					
1 : 1	109,6	96,6	23,5	0,0	76,5
1 : 10	109,6	100,7	9,5	0,5	90,0
10 : 1	98,1	96,2	7,5	1,5	91,0
1 : 0	101,9	93,2	20,0	–	80,0
0 : 1	98,1	91,7	–	0,0	100,0
Kontrola; Control	100,0 a)	100,0 b)	–	–	–

Ciąg dalszy tabeli 2; Table 2 continued

Łęźwian grubonasienny; Chickling vetch large seeded					
1 : 1	119,2	117,9	19,5	0,0	80,5
1 : 10	113,5	124,2	12,5	0,5	87,0
10 : 1	111,5	116,2	11,5	1,0	87,5
1 : 0	115,4	117,9	24,5	–	75,5
0 : 1	103,8	116,8	–	0,5	99,5
Kontrola; Control	100,0 a)	100,0 b)	–	–	–

- a) Plon nasion w kontroli łądzwianu odmiany drobno- i grubonasiennej wynosił średnio 520 g·m⁻²; Yield of seeds in control – small and large seeded chickling vetch averaged 520 g·m⁻²
- b) Waga nasion w kontroli łądzwianu odmiany drobnonasiennej wynosi 7,61 g na roślinę, a dla odmiany grubonasiennej 6,49 g na roślinę; Weight of seeds in control – small seeded chickling vetch 7.61 g per plant and for large seeded chickling vetch 6.49 g per plant

W tabeli 2 przedstawiono wyniki konkurencyjności badanych szczepów dla obydwu odmian łądzwianu, w porównaniu z uzyskanymi efektami symbiozy, tj. plonami i masą nasion.

We wszystkich doświadczeniach obserwowano stopień zasiedlenia brodawek szczepami glebowymi w ok. 85%, a tylko w 15% brodawek stwierdzano obecność *R. leguminosarum* bv. *viciae* R6. Szczep 10 występował tylko w pojedynczych brodawkach (tab. 2). Można zatem wnioskować o silnej dominacji szczepów endogennych gleby z Felina nad stosowanymi przez nas inokulantami *R. leguminosarum* bv. *viciae* R6 i 10. Jedynie szczep R6 mógłby znaleźć zastosowanie w szczepionkach dla łądzwianu grubonasiennego, gdy po kilkakrotnych pasażach w warunkach glebowych, udałoby się wyselekcjonować klony dobrze przystosowane do danego środowiska.

Metoda identyfikacji reizolantów stosowana w tej pracy, jest bardzo pracochłonna i ogranicza tym samym ilość analizowanych brodawek. W aktualnie prowadzonych przez nas badaniach nad konkurencją, stosujemy metodę znakowania szczepów genem *gusA* [WILSON i in. 1995], umożliwiającą uzyskanie barwnego efektu w różnicowaniu brodawek zasiedlonych szczepem GUS⁺ i GUS⁻. Połączenie dwóch metod znakowania, tj. genem *gusA* i opornością na antybiotyki oraz bakteriofagi, umożliwiłoby ustalenie z większą dokładnością mieszanego zasiedlania brodawek przez różne szczepy.

Wnioski

1. Stosowane w doświadczeniach formy łądzwianu drobno- i grubonasiennego wykazywały dobrą zdolność do kiełkowania i brodawkowania pod wpływem wyselekcjonowanych szczepów *Rhizobium*.
2. Konkurencyjność badanych szczepów *R. leguminosarum* bv. *viciae* R6 i 10 ustalano przy zastosowaniu znaczników: (1) oporności na streptomycynę i (2) wrażliwości na 4 bakteriofagi.

3. Stosowane w doświadczeniach szczepy były w różnym stopniu konkurencyjne względem mikroflory endogennej gleby, która dominowała średnio w ok. 85% badanych brodawek.
4. Szczep *R. leguminosarum* bv. *viciae* R6 zakażał ok. 15% brodawek formy drobnonasiennej i 20% grubonasiennej.
5. Szczep *R. leguminosarum* bv. *viciae* 10 reizolowano tylko z pojedynczych brodawek formy grubonasiennej (0,5%), natomiast z formy drobnonasiennej w ogóle nie był izolowany.
6. Plony nasion z 1 m² oraz masa nasion z jednej rośliny wyraźnie wzrastały w wyniku szczepienia *Rhizobium* – formy grubonasiennej, w przeciwieństwie do formy drobnonasiennej.
7. Szczepienie *R. leguminosarum* bv. *viciae* R6 i 10 powodowało wzrost plonów i masy nasion formy grubonasiennej o ok. 18%, a w mieszance nawet ok. 20%.
8. Przygotowanie zestawu szczepów *Rhizobium* do stosowania w inokulacji, wymaga dokładnego rozpoznania uprawianych gatunków a nawet odmian roślin motylkowatych, pod względem zdolności do symbiozy z poszczególnymi szczepami *Rhizobium*.

Literatura

- BEATTI G.A., HANDELSMAN J. 1993. *Evaluation of a strategy for identifying nodulation competitiveness genes in Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. Journal of General Microbiology 139: 529–538.
- DOWLING D.N., BROUGHTON W.J. 1986. *Competition for nodulation of legumes*. Ann. Rev. Microbiol. 40: 131–157.
- DZIAMBA S. 1994. *Lędźwian podlaski*. Farmer 3: 19.
- GŁOWACKA M. 1990. *Możliwości zwiększenia symbiotycznego wiązania azotu*. Post. Mikrobiol. XXIX(1/2): 17–26.
- JENSEN E.S., SORENSEN L.H. 1987. *Survival of Rhizobium leguminosarum in soil after addition as inoculant*. FEMS Microbiol. Ecol. 45: 221–226.
- KOWALCZUK E., LORKIEWICZ Z., STANIEWSKI R. 1995. *Competitiveness for nodulation of R. leguminosarum* bv. *viciae* conjugated with *Azotobacter vinelandii*. Acta Microbiol. Polon. 44(2): 119–125.
- LORKIEWICZ Z. 1994. *Konkurencja Rhizobium w brodawkowaniu roślin motylkowatych*. Post. Mikrobiol. XXXIII(2): 137–146.
- MAŁEK W. 1991. *Symbioza Rhizobium z roślinami motylkowatymi*. Post. Mikrobiol. XXX(3): 281–297.
- MARTENSSON A.M., GUSTAFSSON J. 1985. *Competition between R. trifolii strains for nodulation, during growth in a fermenter and in soil-based inoculants studied by ELISA*. Journal of General Microbiology 131: 3077–3082.
- MILCZAK M. 1992. *Białko nie tylko dla biednych*. Rolnik 5: 11.
- MILCZAK M., MASŁOWSKI J., MILCZAK M., KALBARCZYK J. 1993. *Co przemawia za celo-*

wością uprawy łądzianu siewnego jako warzywa. Ogólnopolskie sympozjum pt. „Nowe rośliny i technologia w ogrodnictwie”. Poznań, 23–24 IX 1993: 45–47.

PODBIELKOWSKI Z. 1985. *Słownik roślin użytkowych*. PWRiL Warszawa: 111.

SZAFER W., KULCZYŃSKI S., PAWŁOWSKI B. 1986. *Rośliny polskie*. PWN, Warszawa: 375–376.

THOMPSON J.A. 1991. *Report on expert consultation on legume inoculant production and quality control*. FAO, Roma.

VINCENT J.M. 1970. *A manual for the practical study of root – nodule bacteria*. Blackwell Scientific Publ., Oxford-Edinburgh.

WILSON K.J., SESSITSCH A., CORBO J.C., GILLER K.E., AKKERMANS A.D.L., JEFFERSON R.A. 1995. β -glucuronidase (*GUS*) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram – negative bacteria. *Microbiology* 141: 1691–1705.

Słowa kluczowe: konkurencyjność, efektywność, łądzian siewny (*Lathyrus sativus* L.), *Rhizobium*

Streszczenie

Przeprowadzono badania polowe nad zakaźnością łądzianu siewnego (*Lathyrus sativus* L.) drobnonasiennego (populacja z odm. Miłków) i grubonasiennego (populacja ze Słowacji) przez wyselekcjonowane szczepy *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* R6 i 10.

Szczepienia nasion dokonywano w różnych proporcjach (1:10, 10:1 i 1:1) hodowli *Rhizobium* R6 i 10, znakowanych opornością na streptomycynę i wrażliwością na 4 bakteriofagi.

W celu określenia konkurencyjności badanych szczepów, identyfikację rezolantów z brodawek przeprowadzono na podstawie analizy zgodności cech antybiotyko- i fagowrażliwości z inokulantami.

Ogólnie stwierdzono znaczącą przewagę dzikich szczepów endogennych *Rhizobium* (70–90%) w zasiedlaniu brodawek obydwu odmian łądzianu.

Konkurencyjność między bakteriami szczepionkowymi a mikroflorą glebową była najwyższa dla szczepu R6 (dla trzech odmian na poziomie ok. 20%), natomiast szczep *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 10 zakażał łądzian tylko śladowo (ok. 1%).

Efektywność symbiozy dla badanych szczepów sięgała do 100–520 g nasion na m², w zależności od odmiany łądzianu. Zakażanie nasion mieszankami szczepów inokulantów powodowało wzrost plonów z m² i masy nasion z jednej rośliny o 15–24%, w przypadku odmiany grubonasiennej.

COMPETITION BETWEEN INOCULATING RHIZOBIAL STRAINS
AND INDIGENOUS RHIZOBIA FOR NODULATION OF *Lathyrus sativus* L.

Zbigniew Lorkiewicz¹, Edyta Kowalczuk¹, Szymon Dziamba²,
Aleksandra Górską-Melke¹, Mirosław Brzozowski¹, Jolanta Kołtun¹

¹Institute of Microbiology and Biotechnology,
Maria Curie Skłodowska University, Lublin

² Department of Crop Production, Agricultural University, Lublin

Key words: competitiveness, effectiveness, chickling vetch, rhizobia

Summary

Field studies were carried out to determine the competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains R6 and 10 for nodulation of chickling vetch. Two varieties of *Lathyrus* were tested: small- and large- seeded. Inoculations were carried out by *Rhizobium* R6 and 10 in different ratios (1:10, 10:1 and 1:1) marked with streptomycin – resistance as well as with sensitivity to four phages. The strains isolated from plant nodules were identified with antibiotic resistance and phage sensitivity. Among the nodule reisolates prevailed indigenous *Rhizobium* strains (70–90%). The competitiveness of the inoculant strain R6 obtained 20% on two plant varieties. On the other hand strain 10 showed very low competitiveness (1%), seed yields of plants inoculated with the mixture of both rhizobial strains tested ranged from 100 to 520 g seeds per m² and was dependent on plant variety. It is interesting to note that plants inoculated with the mixtures of inoculants showed 15–24% increase of seed yields in large – seeded variety.

Prof. dr hab. Zbigniew Lorkiewicz, czł. rzec. PAN
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19
20–033 LUBLIN