

KONKURENCYJNOŚĆ I EFEKTYWNOŚĆ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* NA DWÓCH ODMIANACH SOCZEWICY JADALNEJ (*Lens culinaris* Medik.)

Zbigniew Lorkiewicz¹, Edyta Kowalczyk¹, Szymon Dziamba², Aleksandra Górską-Melke¹, Anna Zagórska¹, Jolanta Kołtun¹

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

² Katedra Szczegółowej Uprawy Roślin, Akademia Rolnicza w Lublinie

Wstęp

W skali globalnej 20% spożywanego białka pochodzi z roślin motylkowatych [LORKIEWICZ 1994]. Zdolność do tworzenia przez nie układów symbiotycznych, pozwala na nowoczesne zabiegi agrotechniczne, m.in. na inokulację szczepami odpowiednich bakterii, zamiast stosowania drogich i szkodliwych dla ludzi i zwierząt nawozów mineralnych.

Soczewica jadalna (*Lens culinaris* Medik.) [PODBIELKOWSKI 1985], żyjąca w symbiozie z *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, stanowi bogate źródło składników odżywczych i wyróżnia się wysokimi walorami smakowymi. Znana była już w starożytnym Egipcie, Grecji, Rzymie i Judei, obecnie jest również uprawiana w Polsce we wschodnich województwach.

Nasiona zawierają około 30% łatwostrawnego białka i do 40% skrobi, natomiast niewielką ilość tłuszczu (ok. 1,5%) i cukru (2%), co pozwala na ich stosowanie w diecie niskokalorycznej (100 g nasion soczewicy jadalnej zawiera 350 kcal). Również słoma i plewy stanowią wartościową paszę dla zwierząt [KOJ 1965; PIROG, ŚMIAŁKOWSKI 1984].

W celu uzyskania lepszych plonów roślin motylkowatych, stosuje się odpowiednie szczepionki bakteryjne z uwzględnieniem specyficzności gatunków *Rhizobium* i roślin oraz wysokiej efektywności symbiotycznej szczepów i ich konkurencyjności względem dzikich bakterii glebowych. Plony nasion po szczepieniu odpowiednimi inokulantami mogą wzrosnąć nawet o 50% [GŁOWACKA 1990].

Materiał i metody

Nasiona soczewicy jadalnej pochodziły z Katedry Szczegółowej Uprawy Roślin Akademii Rolniczej w Lublinie.

W badaniach stosowano dwie odmiany drobnonasienne soczewicy jadalnej (*Lens culinaris* Medik.) – Trebisovska i YEC 188.

Szczep *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* R6 był izolowany w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej z bobiku odm. Nadwiślański w Czesławicach, a następnie koniugowany z *Azotobacter vinelandii*.

Szczep *R. leguminosarum* bv. *viciae* 14 został wyizolowany z brodawek bobiku odm. Pikułowiecki w okolicach Lwowa.

Fagi stosowane w badaniach, aktywne wobec szczepów *R. leguminosarum*, oznaczone 3H, 411, 412 i 543, pochodziły z kolekcji zakładu Mikrobiologii Ogólnej UMCS w Lublinie.

Podłoża – szczepy *Rhizobium* używane w doświadczeniach były namnażane na podłożu stałym i płynnym „79CA” [KOWALCZUK i in. 1995]. Nasiona sterylizowano w 0,1% HgCl_2 oraz 75% alkoholu etylowym, a następnie rozkładano na powierzchni bezazotowego agaru „R”, w celu ich wykiełkowania [VINCENT 1970].

Nasiona zakażano przed siewem badanymi szczepami *R. leguminosarum* bv. *viciae* R6 i 14 oraz ich mieszkankami w proporcjach 1:1, 1:10 i 10:1, sporządzonymi w bezazotowym podłożu płynnym „R” o gęstości 10^9 do 10^{10} komórek bakterii na cm^3 .

Siew nasion przeprowadzano ręcznie na mikropoletkach gospodarstwa Akademii Rolniczej w Felinich, o powierzchni 1 m^2 , w rozstawie $20 \text{ cm} \times 2,5 \text{ cm}$, po 200 nasion na poletko, w 3–4 powtórzeniach.

W okresie intensywnego kwitnienia roślin (koniec czerwca), pobierano z każdego poletka po 2–3 korzenie, z których oddzielano brodawki. Z wyjąłwionych brodawek (metodą stosowaną do sterylizacji nasion), izolowano szczepy *Rhizobium* do określenia konkurencyjności. Pozostałe rośliny zbierano z pola w sierpniu i młócono, a nasiona z każdego poletka liczono i ważono, w celu określenia efektywności symbiozy jako plon nasion z 1 m^2 .

Identyfikacja reizolantów ze szczepem inokulanta: szczepy użyte do zakażenia soczewicy jadalnej były wyznakowane pod względem oporności na streptomycynę oraz wrażliwości na fagi *Rhizobium* 3H, 411, 412 i 543. Szczep 14 był odporny, a szczep R6 wrażliwy na wszystkie 4 fagi. Wyraźne zróżnicowanie wykazywały szczepy również pod względem oporności na streptomycynę – szczep 14 był wrażliwy na $5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, a szczep R6 – odporny na $100 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Z każdej kombinacji szczepów wyizolowano z 20 brodawek po 10 kolonii i sprawdzono zgodność ich cech (strepto- mycyno- i fagowrażliwość) ze szczepem inokulanta użytym do zakażenia nasion. Brak zgodności cech wskazywało na zasiedlenie brodawki przez szczepy endogenne gleby.

Wyniki i dyskusja

Stosowane w badaniach odmiany soczewicy jadalnej drobnonasiennej Trebisovska i YEC 188, charakteryzowały się różną plennością (tab. 1). Plon nasion z 1 m^2 był ponad dwukrotnie wyższy u odmiany Trebisovska ($387 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$) od odmiany YEC 188 ($160 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$). Wyższa była także masa nasion z 1 rośliny u odmiany Trebisovska (2,4 g) od odmiany YEC 188 (0,9 g).

Obsada roślin przed zbiorem w kontrolach nieszczepionych była u obydwu odmian wyrównana (163 i $171 \text{ szt}\cdot\text{m}^{-2}$), natomiast na poletkach odmiany YEC 188 była niższa (szczep R6) lub bliska kontroli (szczep 14).

Na poletkach doświadczalnych z odmianą Trebisovska obserwowano lekki wzrost obsady po szczepieniu *R. leguminosarum* 14 i spadek obsady roślin w wyniku szczepienia *R. leguminosarum* R6 (tab. 1).

Tabela 1; Table 1

Plony nasion soczewicy jadalnej szczepionej *R. leguminosarum* bv. *viciae*, uzyskane w doświadczeniu polowym

Yields of lentil seeds inoculated with *R. leguminosarum* bv. *viciae* in field experiment

<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 14 : R6	Obsada roślin (szt.·m ⁻²) Plants density (no.·m ⁻²)	Przed zbiorom Before harvest (%) a)	Plon nasion Yield of seeds (g·m ⁻²)	Masa nasion g na roślinę Weight of seeds g per plant	Masa tysiąca nasion – MTN Weight of thousand seeds – WTS (g)
YEC 188					
1 : 1	165,0	82,5	179,3	1,086	21,2
1 : 10	95,0	47,5	77,3	0,814	20,5
10 : 1	173,8	86,9	190,5	1,096	20,0
1 : 0	152,5	76,3	155,3	1,018	20,0
0 : 1	65,0	32,5	66,8	1,028	21,2
Kontrola Control	171,3	85,7	160,3	0,935	19,7
Trebisovska					
1 : 1	163,3	81,7	462,0	2,829	40,4
1 : 10	108,3	54,1	340,0	3,195	37,5
10 : 1	181,7	90,5	471,7	2,596	39,1
1 : 0	171,7	85,9	467,0	2,719	39,3
0 : 1	81,7	40,9	303,7	3,717	39,7
Kontrola Control	163,3	81,7	387,0	2,369	38,8
NIR _{0,05} ; LSD _{0,05}	25,1	–	72,9	0,041	1,5

a) 100 % obsady roślin=200 roślin na m²; 100% plant density=200 plants per m²

Porównanie masy nasion w g na roślinę z poletek kontrolnych i szczepionych, wskazuje na jej wzrost głównie u odmiany Trebisovska, szczepionej *R. leguminosarum* R6, mimo około 50% spadku obsady roślin tej odmiany. Może to wynikać ze zwiększenia przestrzeni życiowej roślin rosnących na poletkach o najniższych obsadach na 1 m². U odmiany YEC 188 szczepionej *Rhizobium* R6 efektu tego nie obserwowano, masa nasion na roślinę była tylko nieco wyższa od kontroli nieszczepionej, a spadek obsady roślin dochodził do 48%.

Wcześniej przeprowadzone przez nas badania nad efektem szczepienia *R. leguminosarum* bv. *viciae* R6 dwóch odmian lędźwianu i bobiku odm. Nadwiślańskie, nie wykazywały hamowania wschodów roślin.

Nic stwierdzono wyraźnego wpływu szczepienia *Rhizobium* R6 i 14 na masę 1000 nasion (MTN) u obydwu odmian soczewicy jadalnej. Masa 1000 nasion była w kontrolach nieszczepionych dwukrotnie wyższa u odmiany Trebisovska od odm. YEC (39 i 20 g MTN). Na poletkach szczepionych przez *Rhizobium* R6 i 14 MTN była bliska kontroli (tab. 1).

Szczepy *Rhizobium* mogą mieć wpływ na kiełkowanie nasion i wzrost roślin, np. przez produkcję auksyn czy cytokinin o specyficznym działaniu, a także inhibitorów wzrostu roślin [SPAINK 1994]. Mechanizmy ujemnego oddziaływania *Rhizobium* na rośliny są mało poznane lecz są zapewne specyficzne dla obydwu symbiontów.

Przeanalizowano około 2400 szczepów bakterii reizolowanych z brodawek roślin z dwóch odmian soczewicy jadalnej w uprawie polowej, zakażanych *R. leguminosarum* bv. *viciae* R6 i 14 w różnych stosunkach ilościowych z kontrolami (tab. 2).

Tabela 2; Table 2

Konkurencyjność i efektywność symbiotyczna szczepów
R. leguminosarum bv. *viciae* 14 i R6 na soczewicy jadalnej odm. YEC 188 i Trebisovska
Competitiveness and symbiotic effectiveness *R. leguminosarum* bv. *viciae*
14 and R6 on lentil YEC 188 and Trebisovska cvs.

Efektywność; Effectiveness			Konkurencja; Competition		
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 14 : R6	plon nasion yield of seeds g·m ⁻² (%)	masa nasion g na roślinę mass of seeds g per plant (%)	% szczepów reizolantów % of strains identified		
			<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>		szczepy glebowe soil strains
			14	R6	
YEC 188					
1 : 1	111,9	116,1	46,5	6,0	47,5
1 : 10	48,2	87,0	58,0	4,0	38,0
10 : 1	116,8	117,2	60,0	0,0	40,0
1 : 0	96,8	108,9	42,0	0,0	58,0
0 : 1	41,7	109,9	0,0	15,0	85,0
Kontrola; Control	100,0 a)	100,0 c)	0,0	0,0	100,0
Trebisovska					
1 : 1	119,4	119,4	40,0	11,0	49,0
1 : 10	89,4	134,9	50,0	6,0	44,0
10 : 1	121,9	109,6	55,0	3,0	42,0
1 : 0	120,7	114,8	38,0	0,0	62,0
0 : 1	78,5	156,9	0,0	13,0	87,0
Kontrola; Control	100,0 b)	100,0 d)	0,0	0,0	100,0

- a) Plon nasion w kontroli odmiany YEC 188=160,3 g·m⁻²; Yield of seeds in control =160,3 g·m⁻² (YEC 188)
 b) Plon nasion w kontroli odmiany Trebisovska=387,0 g·m⁻²; Yield of seeds in control =387,0 g·m⁻² (Trebisovska)
 c) Masa nasion na roślinę w kontroli odmiany YEC 188=0,935 g; Weight of seeds in control =0,935 g per plant (YEC 188)
 d) Masa nasion na roślinę w kontroli odmiany Trebisovska=2,369 g; Weight of seeds in control=2,369 g per plant (Trebisovska)

Na podstawie analizy znaczników wrażliwości na streptomycynę i bakteriofagi szczepów *Rhizobium*, wykazano że 40–80% brodawek zasiedlonych zostało przez dzikie szczepy flory endogennej gleby.

Na podstawie porównania konkurencyjności szczepów inokulantów i bakterii glebowych stwierdzono (tab. 2), że bardziej konkurencyjny w zakażaniu okazał się szczep *R. leguminosarum* 14, który zasiedlał 38–60% brodawek obydwu odmian soczewicy jadalnej. Szczep *R. leguminosarum* bv. *viciae* R6 identyfikowano średnio w około 14% brodawek, nawet gdy szczepiono czystą hodowlą *R. leguminosarum* R6. Wyniki te wskazują na lepszą przydatność szczepu *R. leguminosarum* bv. *viciae* 14 do zastosowania w szczepionkach (tab. 2).

W doświadczeniach polowych często wysokoefektywne szczepy *Rhizobium* wyselekcjonowane w warunkach laboratoryjnych, po wprowadzeniu do gleby nie dają oczekiwanych efektów z powodu niskiej konkurencyjności. Otrzymanie szczepionki zawierającej *Rhizobium* o wysokiej konkurencyjności w stosunku do mikroflory endogennej, a jednocześnie wysoko efektywne w wiązaniu azotu, jest celem badań w wielu laboratoriach. DOWLING i BROUGHTON [1986] podkreślają, że w doborze szczepów do inokulacji należy także uwzględnić wpływ wielu czynników genetycznych i środowiskowych, na przebieg poszczególnych etapów symbiozy.

Wnioski

1. Na poletkach szczepionych *R. leguminosarum* bv. *viciae* R6, stwierdzono zahamowanie wschodów soczewicy jadalnej i spadek obsady roślin.
2. Plon nasion z 1 m² w stosunku do kontroli nieszczepionej był wyraźnie niższy z poletek szczepionych *R. leguminosarum* bv. *viciae* R6.
3. Efektywność symbiozy szczepu *R. leguminosarum* bv. *viciae* 14 była wyższa od szczepu R6, co przejawiało się wzrostem plonów nasion w porównaniu z poletkami kontrolnymi.
4. Konkurencyjność szczepu *R. leguminosarum* bv. *viciae* 14 w stosunku do mikroflory glebowej była wyższa od szczepu R6, który był także mniej infekcyjny w mieszanym zakażeniu obydwoma szczepami.

Literatura

- DOWLING D.N., BROUGHTON W.J. 1986. *Competition for nodulation of legumes*. Ann. Rev. Microbiol. 40: 131–157.
- GŁOWACKA M. 1990. *Możliwości zwiększenia symbiotycznego wiązania azotu*. Post. Mikrobiol. XXIX (1-2): 17–26.
- KOJ F. 1965. *Ocena wartości odżywczej białka niektórych roślin strączkowych*. Dział Wydawnictw SGGW, Warszawa.
- 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.
- PIRÓG M., ŚMIAŁKOWSKI J. 1984. *Ocena wybranych cech morfologicznych soczewicy jadalnej*. Biul. Inst. Hodowli i Aklimatyzacji Roślin 155: 17–185.
- PODBIELKOWSKI Z. 1985. *Słownik roślin użytkowych*. PWRiL Warszawa: 111.

SPAINK H.P. 1994. *The molecular basis of the host specificity of Rhizobium bacteria*. Anton van Leeuwenhoek 65: 81–98.

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

Słowa kluczowe: konkurencyjność, efektywność, symbioza, *Rhizobium*, soczewica jadalna (*Lens culinaris* Medik.)

Streszczenie

W doświadczeniach polowych badano konkurencyjność i efektywność szczepów *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* R6 i 14, na dwóch odmianach soczewicy jadalnej (*Lens culinaris* Medik.) – Trebisovska i YEC 188.

W brodawkach obydwu odmian stwierdzono wyraźną dominację endogennej mikroflory glebowej.

Konkurencyjność między badanymi szczepami *Rhizobium* była zróżnicowana. Szczep 14 był reizolowany z 38–60% brodawek obydwu form soczewicy jadalnej, natomiast szczep R6 zasiedlał tylko 4–15% brodawek.

Wpływ szczepienia soczewicy jadalnej *R. leguminosarum* bv. *viciae* R6 lub 14, na plony i masę nasion był znacznie wyraźniejszy u formy Trebisovska (szczep R6 powoduje wzrost nawet do 35%), która także w kontrolach nieszczepionych była dwukrotnie plenniejsza od odmiany YEC 188.

COMPETITIVENESS AND EFFECTIVENESS OF *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* TESTED ON TWO *Lens culinaris* Medik. VARIETIES

Zbigniew Lorkiewicz¹, Edyta Kowalczyk¹, Szymon Dziamba²,
Aleksandra Górską-Melke¹, Anna Zagórska¹, Jolanta Kołtun¹

¹Institute of Microbiology and Biotechnology,

Maria Curie Skłodowska University, Lublin

²Department of Crop Production, Agricultural University, Lublin

Key words: competitiveness, effectiveness, symbiosis, *Rhizobium*, lentil

Summary

Rhizobium leguminosarum bv. *viciae* R6 and 14 strains were tested on lentil varieties Trebisovska and YEC 188. In field experiments dominated generally indigenous *Rhizobium* strains. The competitiveness of both tested strains differed significantly. Strain 14 was reisolated from 38–60% nodules of both lentil varieties, whereas strain R6 was identified only in 4–15% nodules examined. Seed yields on the Trebisovska variety surpassed twice that of the YEC 188 variety. Inoculation of the Trebisovska variety lentil produced yield increase even by 35%.

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