

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 1, Number 307 (2015), 115 – 124

**CRITERIA OF SELECTION OF STRAINS OF NODULE BACTERIA
IN STRUCTURE OF BIOLOGICAL PREPARATIONS
FOR ENRICHMENT OF THE SOIL BY BIOLOGICAL NITROGEN
AND INCREASE OF PRODUCTIVITY OF BEAN CULTURES**

A. K. Sadanov¹, N. N. Gavrilova¹, T. N. Dadonova², I. A. Ratnikova¹

¹Institute of Microbiology and Virology" CS MES RK, Almaty, Kazakhstan,

²AS «Parasat»*, Astana, Kazakhstan.

E-mail: iratnikova@list.ru

Key words: nodule bacteria, leguminous plants, symbiosis, competitiveness, virulence, nitrogenous activity, coordinated selection.

Abstract. The coordinate selection aimed at obtaining combinations of Rhizobia strains with high nitrogen-fixing activity and of plant sorts using the fixed nitrogen for full development and formation of a big crop is necessary for creation of effective biological preparations on the basis of nodule bacteria. The indicator of nitrogenous activity is most suitable at the initial stages of selection a Rhizobium connected with rejection inactive strains. In further researches for identification of genotypes with maximum efficiency of symbiosis is much more efficient selection of Rhizobium on their ability to influence accumulation of nitrogen in plants that correlates with their mass.

The competition between strains is influenced by limitation of microbes and plants in the nutrients, and also properties of the soil - humidity, acidity, temperature, structure, organic matter content. Among biotic factors are the number and properties of local microorganisms, including predatory protozoa, the rate of formation of nodules associated with autoregulatory effects, the synthesis of exopolysaccharides, a method of application and mobility of the inoculum of bacteria.

A detailed study of the mechanisms of interaction of plants with rhizobia opens up the possibility to create the most specific combinations of a cultivar-strain, in order to increase the competitiveness of industrial strains, as well as to maximize the effectiveness of symbiotic nitrogen fixation in the field conditions.

УДК 579.66:631.461.5

**КРИТЕРИИ ОТБОРА ШТАММОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ
В СОСТАВ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ОБОГАЩЕНИЯ ПОЧВЫ
БИОЛОГИЧЕСКИМ АЗОТОМ И ПОВЫШЕНИЯ УРОЖАЙНОСТИ
БОБОВЫХ КУЛЬТУР**

А. К. Саданов¹, Н. Н. Гаврилова¹, Т. Н. Дадонова², И. А. Ратникова¹

¹РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан,

²АО «Парасат», Астана, Казахстан

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, бобовые растения, симбиоз, конкурентоспособность, вирулентность, нитрогеназная активность, координированная селекция.

Аннотация. Для создания эффективных биопрепаратов на основе клубеньковых бактерий необходима координированная селекция, направленная на получение комбинаций штаммов ризобий с высокой азотфикссирующей активностью с сортами растений, использующими фиксируемый азот для полноценного развития и формирования высокого урожая. При этом показатель нитрогеназной активности наиболее

пригоден на начальных этапах селекции ризобий, связанных с отбраковкой неактивных штаммов. В дальнейших исследованиях для выявления генотипов с максимальной эффективностью симбиоза значительно более результативной является селекция ризобий по способности влиять на накопление азота в растениях, что коррелирует с их массой.

На конкуренцию между штаммами влияют ограниченность микробов и растений в источниках питания, а также свойства почвы - влажность, кислотность, температура, структура, содержание органики. Среди биотических факторов особенно важны численность и свойства местных микроорганизмов, включая хищных простейших, скорость образования клубеньков, связанная с авторегуляторными эффектами, синтез экзополисахаридов, способ применения инокулюма и подвижность бактерий.

Детальное изучение механизмов взаимодействия растений с клубеньковыми бактериями открывает возможности для создания наиболее специфических комбинаций сорт-штамм с целью повышения конкурентоспособности промышленных штаммов, а также для достижения максимальной эффективности симбиотической азотфиксации в полевых условиях.

Одним из радикальных путей восстановления плодородия почв является введения в севооборот кормовых и пищевых бобовых культур. Особенностью бобовых является способность обеспечивать себя азотом за счет симбиоза с клубеньковыми бактериями, превращающими атмосферный азот в формы, доступные для минерального питания растений. В свою очередь, корневые и пожнивные остатки бобовых служат богатым источником азотного питания и для сельскохозяйственных культур, возделываемых вслед за ними на этом поле. Количество азота, которое при этом может быть накоплено в почве, составляет до 600 кг на гектар, что намного превышает потребности самого бобового и обеспечивает связанным азотом последующие культуры [1]. Однако в реальных условиях почвы данная возможность реализуется только при определенных условиях - наличия в почве эффективных и специфичных штаммов клубеньковых бактерий.

Способность бактерий к симбиозу определяется генами, локализованными не в основной хромосоме, а в плазмidaх [2], которыми бактериальные клетки могут активно обмениваться, осуществляя горизонтальный перенос генов [3], либо просто утрачивать их, теряя и способность к азотфиксации. Поскольку в почве в свободном состоянии клубеньковые бактерии азот не фиксируют, их выживаемость вне растения не зависит от потенциальной способности к азотфиксации, которая наступает только при взаимодействии с бобовыми. По этой причине большинство природных штаммов клубеньковых бактерий имеют низкую эффективность симбиотической азотфиксации, либо не способны к ней вообще. Такие штаммы, однако, не утрачивают вирулентности и зачастую оккупируют клубеньки бобовых культур весьма активно, вытесняя производственные штаммы, вносимые в виде микробиологических препаратов. Это значительно понижает эффективность действия препаратов и зачастую проявляется в экспериментальных условиях как отсутствие положительного влияния инокуляции микробиологическим препаратом. В связи с этим, важно определить показатели, по которым следует отбирать штаммы клубеньковых бактерий для создания биоудобрений.

Известно, что эффективность азотфиксации симбиотической ассоциации бобовое растение – клубеньковые бактерии определяется наличием у клубеньковых бактерий целого комплекса симбиотических признаков: вирулентности – способности клубеньковых бактерий входить в контакт с корневой системой бобовых растений, проникать в ткани корня, размножаться в них и индуцировать образование клубеньков; азотфиксирующей активности – способности связывать молекулярный азот атмосферы при помощи специальной ферментативной системы и превращать его в ионы аммония; конкурентоспособности – способности внесенного в почву определенного штамма клубеньковых бактерий образовывать клубеньки в присутствии других штаммов того же вида; специфичности – способности вступать в эффективный симбиоз со строго определенным набором сортов и видов бобовых растений.

В процессе инфекции корневой системы бобовых растений клубеньковыми бактериями большое значение имеет вирулентность микроорганизмов. Если специфичностью определяется спектр действия бактерий, то вирулентность клубеньковых бактерий характеризует активность их действия в пределах данного спектра.

Заражение корней бобовых растений азотфиксирующими бактериями происходит через корневые волоски. Бактерии прорастают в них в виде инфекционной нити до самого основания.

В коре корня происходит разветвление инфекционной нити и распределение бактерий по клеткам. В месте локализации бактерий клетки коры корня разрастаются, образуя клубеньки. Азотфикссирующие клубеньки имеют красноватую или розоватую окраску из-за наличия пигмента леггемоглобина. Полноценный симбиоз корней бобовых с клубеньковыми бактериями возможен лишь при оптимальном содержании в почве калия, фосфора и ряда микроэлементов (Мо, Со, В), подходящем уровне кислотности почвы, соблюдении рекомендуемых агротехнических приемов и бактеризации семян видоспецифичными и жизнеспособными штаммами клубеньковых бактерий.

Если в хозяйстве постоянно используются бактериальные удобрения, то сохраняющаяся в почве популяция азотфикссирующих клубеньковых бактерий снижает видимую эффективность повторного их использования, то есть, количество клубеньков на корнях растений, выросших из обработанных семян, увеличивается на 10-15% по сравнению с контролем. Если же подобные удобрения не использовались в хозяйстве ранее, то количество клубеньков может возрасти на 50-200%. У большинства бобовых потенциал симбиотической азотфиксации, определяемый в оптимальных для нее условиях, в три-четыре раза превышает уровень, реально достигаемый в производственных условиях [4].

Анализ энергетического и азотно-углеродного баланса растений подтвердил, что путем селекции бобовых и совершенствования технологий применения микробных препаратов интенсивность симбиотической азотфиксации может быть увеличена не менее чем в три раза [5].

В связи с тем, что большинство почв характеризуется дефицитом доступных для ассимиляции корнями форм азота (нитраты, аммоний), многие группы растений обладают двумя типами азотного питания – симбиотрофным (благодаря кооперации с азотфикссирующими прокариотами: ризобиями, актиномицетами, цианобактериями, ризосферными и эндофитными бактериями) и автотрофным (самостоятельное усвоение азотных соединений) [6]. Тот факт, что культурные бобовые часто не способны к симбиотрофному питанию азотом может быть связан с длительным возделыванием и селекцией растений в условиях достаточного, а часто и избыточного обеспечения азотом. Селекция, проводимая в отсутствии контроля за симбиотическими признаками, не могла не привести к обеднению генофонда растений наследственными факторами, контролирующими симбиотрофное питание.

При продвижении растений в новые места обитания их сопровождают не только патогены, но и симбиотические организмы, обеспечивающие адаптацию своих хозяев к новым почвенно-климатическим условиям [7, 8]. Хотя бобовые лишены способности к “вертикальному” наследованию корневых симбионтов, последние могут передаваться от материнских растений к дочерним через семена [9].

При окультуривании растений и их интродукции в новые места обитания эволюционные процессы, неблагоприятные для симбиоза, затрагивают не только растения, но и микроорганизмы. Повышение скорости эволюции ризобий при доместикации их хозяев может быть связано с дисбалансом природных симбиозов и с возникновением мощных селективных давлений в пользу новых симбиотических микроорганизмов [10]. Однако действующий при этом отбор затрагивает в первую очередь быстро эволюционирующие признаки, такие как вирулентность и конкурентоспособность. Уровень симбиотической эффективности, которая по механизмам эволюции может резко отличаться от вирулентности [11], в таких условиях может снижаться, о чем говорит тот факт, что наиболее многочисленные генетические классы, выявляемые в популяциях ризобий, часто представлены малоактивными в отношении азотфиксации штаммами [12-14]. Результатом этого может стать формирование высоко конкурентоспособной, но симбиотически малоактивной микрофлоры, которая оказывается существенным препятствием на пути интродукции в агроценозы производственных штаммов ризобий.

Основные показатели, с помощью которых можно оценить связь эффективности и специфичности симбиоза – масса растений и накопление в них азота, причем величина второго показателя, как правило, возрастает при инокуляции ризобиями значительно, чем первого [4]. В целом, для культурных растений характерна сниженная по сравнению с дикорастущими формами эффективность симбиоза, однако в генофондах бобовых сохраняется определенное количество симбиотически активных форм, которые могут и должны быть вовлечены в селекцию. Изучение этих форм позволяет установить связь симбиотических признаков между собой и с другими

агробиологическими свойствами растений, что является важным условием успешной работы по улучшению симбиотических систем.

Высокая внутри- и межсортовая изменчивость по признакам симбиоза выявлена у многих бобовых культур. Оказалось, что нитрогеназная активность в равной степени варьирует в зависимости от генотипов партнеров, тогда как изменчивость по симбиотической эффективности в основном определяется сортом растений. Следовательно, координированная селекция партнеров должна быть направлена на получение комбинаций штаммов ризобий с высокой азотфикссирующей активностью с сортами растений, использующими фиксируемый азот для полноценного развития и формирования высокого урожая.

Азотфикссирующая активность клубеньковых бактерий является одним из важных признаков, определяющих их симбиотическую эффективность. ОсВ результате изучения системы люцерна – *S. meliloti* выяснилось, что при испытании бактериальных штаммов, контрастно различающихся по симбиотическим свойствам (например, Fix^+ и Fix^- штаммов), обычно наблюдается сильная корреляция нитрогеназной (ацетилен-редуктазной) активности (APA) и прибавки массы растений. Однако, если в испытание взяты штаммы, лишь количественно различающиеся по азотфикссирующей активности, то корреляция этих признаков часто оказывается слабой и недостоверной [15]. Следовательно, нитрогеназная активность наиболее пригодна на начальных этапах селекции ризобий, связанных с отбраковкой неактивных штаммов, однако ее использование для выявления генотипов с максимальной эффективностью симбиоза ограничено. Селекция штаммов ризобий по нитрогеназной активности в данных условиях возможна, однако ее результативность в отношении эффективности симбиоза будет невысокой. Значительно более результативной может быть селекция ризобий по способности влиять на накопление азота в растениях, что коррелирует с их массой. Это различие может быть связано с тем, что накопление азота отражает азотфикссирующую активность за весь период вегетации, тогда как APA позволяет оценивать азотфиксацию в течение небольшого промежутка времени, когда активность нитрогеназы может подвергаться случайным колебаниям. Важно отметить, что величина общего накопления азота в растениях достоверно коррелирует как с их массой, так и с удельным содержанием азота. Несмотря на эти ограничения, APA может быть использована для решения задач, связанных со сравнительной оценкой большого числа растительных или бактериальных генотипов, так как систематические ошибки метода нивелируются в ходе сравнения. Относительная дешевизна и простота определения APA позволяет использовать ее для того, чтобы исключить неактивные в отношении N_2 -фиксации генотипы партнеров, а также среди активных растений и бактерий отобрать формы с максимальным проявлением симбиотических признаков. Особенно удобна APA на первых этапах селекции, когда решается задача отбраковки большого числа растений, в клубеньках которых нитрогеназной активности нет или она низкая.

Важным свойством производственных штаммов клубеньковых бактерий является их конкурентоспособность. Неспособность штаммов-инокулянтов формировать значительное число клубеньков в полевых условиях является одним из основных препятствий для повышения эффективности симбиотической азотфиксации.

На конкуренцию между штаммами влияют многие абиотические и биотические факторы. Наиболее важными абиотическими факторами являются: ограниченность микробов и растений в источниках питания, а также свойства почвы - влажность, кислотность, температура, структура, содержание органики [16-17].

Среди биотических факторов особенно важны: продукция бактериоцинов и антибиотиков [18]; численность и свойства местных микроорганизмов, включая хищных простейших, скорость образования клубеньков, связанная с авторегуляторными эффектами, синтез экзополисахаридов [19, 20]; способ применения инокулума и подвижность бактерий [21-23].

Хотя подвижность и хемотаксис не связаны с образованием клубеньков, они оказались существенными для конкуренции за образование клубеньков, по крайней мере для тех организмов, которые находятся в одном и том же сайте корня. Отмечено, что снижение подвижности ризобий приводит к нарушению конкурентоспособности. Так, мутанты *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, лишенные подвижности, менее конкурентоспособны, чем штамм дикого типа [21]. Предполагается,

что основная проблема, стоящая перед штаммом-инокулянтом в почве, заключается в достижении корня ранее того момента, когда он утратит способность формировать клубеньки.

В некоторых работах показаны конкурентные преимущества штаммов, активно фиксирующих азот, а в других работах такого преимущества не выявлено. У штамма *B. japonicum* получен Тпб-мутант, не способный к симбиотической азотфиксации, однако его способность конкурировать за образование клубеньков на сое не изменена [24].

Таким образом, на конкуренцию между штаммами влияют многие абиотические и биотические факторы.

Видовая специфичность клубеньковых бактерий проявляется в том, что определенные виды (иногда отдельные штаммы) клубеньковых бактерий взаимодействуют только с определенными видами (иногда отдельными генотипами) растений-хозяев [25].

Клубеньковые бактерии формируют симбиотические ассоциации с бобовыми растениями семейства *Leguminosae*, в котором выделяют три подсемейства – *Mimosoideae*, *Papillonoideae* и *Caesalpinoideae*. До 90% видов первого и второго подсемейств и 23% видов третьего способны вступать в симбиоз с клубеньковыми бактериями. Клубеньковые бактерии характеризуются видовой специфичностью (избирательностью) по отношению к растению – хозяину. Определенный вид бактерий обычно образует клубеньки только на одном или нескольких видах бобовых растений. Так, *Rhizobium leguminosarum* инфицирует горох, вику, кормовые бобы, чину и чечевицу; *Rhizobium phaseoli* – фасоль; *Rhizobium japonicum* – сою; *Rhizobium lupini* – люпин, сараделлу; *Rhizobium vigna* – вигну, мак и арахис; *Rhizobium cicer* – нут; *Rhizobium trifolii* – клевер; *Rhizobium meliloti* – люцерну, донник, пажитник; *Rhizobium simplex* – эспарцет; *Rhizobium lotus* – лядвенец.

Специфичность клубеньковых бактерий возникала в результате их длительного приспособления к одному растению или к их группе и генетической передачи этого свойства. В связи с этим различная приспособленность клубеньковых бактерий к растениям имеется и в пределах группы перекрестного заражения. Так, клубеньковые бактерии люцерны могут образовать клубеньки у донника. Но тем не менее они более приспособлены к люцерне, а бактерии донника — к доннику.

Изменить специфичность невозможно никакими физиологическими воздействиями, так как она определяется генетическими механизмами и поэтому только меняя генотип штамма клубеньковых бактерий, можно изменить и его отношение к растению-хозяину. Современная фундаментальная наука достигла значительных успехов в расшифровке механизмов, обеспечивающих специфичность азотфикссирующего симбиоза бобовых растений и клубеньковых бактерий [11].

По современным представлениям, специфичность взаимодействия обеспечивается на уровне передачи сигналов – при узнавании партнерами друг друга. В отсутствие органов чувств бактерии и растения используют сигнальные молекулы, которые позволяют однозначно опознать партнера. Взаимодействие начинается с получения бактериями сигнала от растения – молекул флавоноидной природы, набор которых специфичен для конкретного вида бобового растения. Этот сигнал, связываясь с бактериальным рецептором, активирует транскрипцию бактериальных генов клубенькообразования, неактивных в отсутствие хозяина [26].

Детальное изучение механизмов взаимодействия растений с клубеньковыми бактериями открывает возможности для создания наиболее специфических комбинаций сорт-штамм с целью повышения конкурентоспособности промышленных штаммов, а также для достижения максимальной эффективности симбиотической азотфиксации в полевых условиях.

С учетом специфичности взаимодействия растений и микроорганизмов должно развиваться и производство микробиологических препаратов. Современный уровень развития науки делает актуальным подбор штаммов микроорганизмов не только под конкретную культуру, но и под отдельные, наиболее отзывчивые на инокуляцию сорта.

В настоящее время для повышения урожайности бобовых культур и обогащения почвы биологическим азотом широко применяются удобрения на основе селекционированных штаммов клубеньковых бактерий.

Для инокуляции семян бобовых культур в России и ряде других стран широко применяется микробиологический препарат ризоторфин. Для каждой культуры бобовых растений используют специфические и наиболее эффективные производственные штаммы клубеньковых бактерий, которые получают из Национальной коллекции Ризобиум (ГНУ ВНИИСХМ). Агрономическая

эффективность ризоторфина для бобовых культур составляет в среднем 10-30%, дополнительный сбор белка – 2-5 ц /га. Препарат экономит 50-200 кг минеральных азотных удобрений на га; последействие обработанных ризоторфином многолетних бобовых прослеживается 3-5 лет с прибавками урожая зерновых на 10-15%.

С использованием данных Географической сети на основе более чем 3000 полевых опытов дана сравнительная оценка эффективности биопрепараторов на основе перспективных штаммов в зависимости от вида растений, технологии их применения и возделывания, а также от специфичности реакции генотипов растений на внесение биопрепараторов [27]. Отмечено, что в Северо-Западном федеральном округе России наиболее продуктивными по урожаю зерна были сорта сои Закат, Салют 216 и Nordic. Сорт СибНИИК 315 оказался высокоотзывчивым на инокуляцию и давал устойчивое увеличение урожая на 25,6-137,0 %. Это свидетельствует о том, что использование биопрепараторов на основе клубеньковых бактерий может существенно помочь продвижению сои в северные регионы.

В Центральном федеральном округе при изучении эффекта инокуляции ризоторфином сои на 10 сортах показано, что в годы с невысокой температурой и большим количеством осадков в начале вегетации прибавки от инокуляции достигали 11,2 ц/га, или 55 %. В Курской и Липецкой областях были получены хорошие результаты на сорте ВНИИС 2. В условиях недостатка тепла и влаги урожай инокулированных растений возрастил на 30-60 %. В других регионах России обработка ризоторфином также положительно влияла на продуктивность сои. В Южном регионе прибавка от инокуляции составила 22-36 %, в Приволжском – 49-141 %, в Сибирском – 19-78 %, в Дальневосточном – 7-73 % в зависимости от сорта растения.

При выращивании в Крыму сои сортов Витязь 50, Валюта и Деймос с использованием различных штаммов клубеньковых бактерий также установлено, что в симбиозе сои с клубеньковыми бактериями максимальной эффективности можно достичь только при полном соответствии генотипов растений и клубеньковых бактерий. Исследования показали, что наиболее эффективными для предпосевной обработки семян сои сорта Витязь 50 были штаммы 71т и M8. Прибавка урожайности составила 6,6 ц/га и 5,8 ц/га ,соответственно. Эти же штаммы обеспечили прибавку урожайности сои сорта Валюта на 3,5 ц/га и 3,2 ц/га, соответственно, сорта Деймос – на 4,0 ц/га [28].

В РГП "Институт микробиологии и вирусологии" КН МОН РК (РГП «ИМВ») проведены исследования эффективности производственного штамма *Bradyrhizobium japonicum* АКС-17 на обычновенных светло-каштановых почвах Алматинской области . Урожай зерна сои при обработке семян этим штаммом был выше контроля (без обработки) на 25%. Кроме того, содержание общего азота у растений, инокулированных штаммом *Bradyrhizobium japonicum* АКС-17, увеличивалось при этом на 25,9%, накопление азота в зерне - на 26,7%. Прибавка урожая в среднем составила 5 ц/га.

Несмотря на то, что *Rhizobium* встречаются практически повсюду, однако для различных географических широт и типов почв имеются преимущества в распространении определенных специфичных групп ризобий. Среди наиболее многочисленных зафиксированы *Rh. trifolii*, составляющие $1,7 \cdot 10^5$ клеток на 1 г почвы. К наименее представленным отнесены популяции *Rh. meliloti*, насчитывающие не более 17 клеток на 1 г почвы [29]. Поэтому для посевов люцерны обязательна инокуляция семян соответствующими клубеньковыми бактериями.

Использование ризоторфина для предпосевной обработки семян люцерны дало прибавку урожая зеленої массы в Томской области на 13-20%, Волгоградской области на 32%, в Сохе Якутия – на 65% [30].

Для люцерны также показана перспективность координированной селекции растений и микроорганизмов на подбор комбинаций сорт - штамм со специфичностью взаимодействия [27]. Полученные результаты свидетельствуют о высокой сортовой специфичности растений люцерны по отношению к штаммам клубеньковых бактерий: сорт Селена положительно реагировал только на инокуляцию штаммом А-3 (прибавка урожая 190 %), сорта Агния и Якутская на фоне применения штаммов А-4 и А-3 увеличивали продуктивность на 40 % .

Штамм клубеньковых бактерий под люцерну *Rhizobium meliloti* Л5-1 показал более высокие результаты при полевых испытаниях в Кызылординской области по сравнению со штаммом

Rhizobium meliloti 425a из коллекции ВНИИСХМ (С. Петербург). Так, прибавка урожая сена с применением штамма Л5-1 в среднем составила 83,0 ц/га, а со штаммом 425a- 34,7 ц/га. Содержание протеина в зеленой массе было выше в среднем на 5-6 % [31].

Способность гороха к созданию бобово-ризобиального комплекса имеет сортовую специфику и зависит от сложившихся гидротермических условий вегетационного периода [32]. Современные сорта гороха зернофуражного использования способны сформировать урожайность семян более 45 ц/га. При этом изменение уровня азотного питания растений гороха посредством инокуляции семян препаратом клубеньковых бактерий стимулирует рост стебля и главного корня, способствует увеличению количества образовавшихся клубеньков и повышает урожайность семян на 3,2-6,1 ц/га. Однако применение препарата клубеньковых бактерий не всегда обеспечивает рост урожайности семян. В годы с дефицитом выпавших осадков на фоне температуры воздуха выше средней многолетней нормы отмечается снижение этих параметров [33].

В условиях северной лесостепи Тюменской области изучено влияние препаратов клубеньковых бактерий на продуктивность растений гороха посевного сорта Губернатор. Для инокуляции использовали 7 штаммов (245, 260, 261, 262, 263, 1026, 1076), полученных из лаборатории экологии симбиотических и ассоциативных ризобактерий Всероссийского НИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН (С.-Петербург). По комплексу хозяйствственно-ценных признаков растений гороха, обусловленных инокуляцией клубеньковыми бактериями, выделились два наиболее эффективных штамма 245 и 260 [34].

В вегетационных опытах при предпосевной обработке семян гороха штаммом *Rhizobium leguminosarum* ZG, выделенным из почв Северного Казахстана, их всхожесть повысилась на 27 %. Длина опытных растений превышала длину контрольных в 2,5 раза, длина корней – в 1,4 раза. В зеленой массе гороха, обработанного штаммом ZG, превышение содержания белка по сравнению с контрольными растениями составило 8%, солей фосфора – 0,48%, кальция – 0,34%. Полевые испытания показали [35], что инокуляция семян штаммом *Rhizobium leguminosarum* ZG способствовала увеличению урожайности гороха в пределах 5,7-6,4 ц/га.

Таким образом, для создания эффективных биопрепаратов на основе клубеньковых бактерий необходима координированная селекция, направленная на получение комбинаций штаммов ризобий с высокой азотфиксацией активностью с сортами растений, использующими фиксируемый азот для полноценного развития и формирования высокого урожая. При этом показатель нитрогеназной активности наиболее пригоден на начальных этапах селекции ризобий, связанных с отбраковкой неактивных штаммов. Однако в дальнейших исследованиях для выявления генотипов с максимальной эффективностью симбиоза значительно более результативной является селекция ризобий по способности влиять на накопление азота в растениях, что коррелирует с их массой.

На конкуренцию между штаммами влияют многие абиотические и биотические факторы. Наиболее важными абиотическими факторами являются: ограниченность микробов и растений в источниках питания, а также свойства почвы - влажность, кислотность, температура, структура, содержание органики. Среди биотических факторов особенно важны численность и свойства местных микроорганизмов, включая хищных простейших, скорость образования клубеньков, связанная с авторегуляторными эффектами, синтез экзополисахаридов, способ применения инокулюма и подвижность бактерий.

Для большинства бобовых установлена высокая сортовая специфичность по отношению к штаммам клубеньковых бактерий. Детальное изучение механизмов взаимодействия растений с клубеньковыми бактериями открывает возможности для создания наиболее специфических комбинаций сорт-штамм с целью повышения конкурентоспособности промышленных штаммов, а также для достижения максимальной эффективности симбиотической азотфиксации в полевых условиях. Это обуславливает потребность в селекции активных штаммов клубеньковых бактерий не только под определенные виды бобовых растений, но также специфичные для определенных сортов с учетом почвенно-климатических условий.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Берестецкий О.А., Доросинский Л.М., Кожемяков А.П. Эффективность препаратов клубеньковых бактерий в Экспериментальной Географической Сети // АН СССР. Сер. биол. – 1987. – № 5. – С. 670-679.

- [2] Fisher H.M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia // Microbiol. Rev. – 1994. – 58. – Р. 352-386.
- [3] Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Роль горизонтального переноса генов в эволюции клубеньковых бактерий, направляемой растением-хозяином // Усп. совр. биол. – 2010. – С. 336-345.
- [4] Кожемяков А.П., Тихонович И.А. Использование инокулянтов бобовых и биопрепараторов комплексного действия в сельском хозяйстве // Докл. РАСХН. – 1998. – № 6. – С. 7-10.
- [5] Вэнс К. Симбиотическая азотфиксация у бобовых: сельскохозяйственные аспекты // Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Под ред. Г. Спайнка, А. Кондоропши, П. Хукаса. – СПб.: Бионт, 2002. – С. 541-564.
- [6] Проворов Н.А. Соотношение симбиотического и автотрофного питания азотом у бобовых растений: генетико-селекционные аспекты // Физиол. растений. – 1996. – Т. 43, № 1. – С. 127-135.
- [7] Richardson D.M., Allsopp N., d'Antonio C.M. et al. Plant invasions – the role of mutualisms // Biol. Rev. – 2000. – Vol. 75. – Р. 65-93.
- [8] Bena G., Lyet A., Huguet T., Olivieri I. Medicago – Sinorhizobium symbiotic specificity evolution and the geographic expansion of Medicago // J. Evol. Biol. – 2005. – Vol. 18. – Р. 1547-1558.
- [9] Perez-Ramirez N.O., Rogel M.A., Wang E. et al. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli* // FEMS Microbiol. Ecol. – 1998. – Vol. 26. – Р. 289-296.
- [10] Проворов Н. А., Воробьев Н. И. Роль межштаммовой конкуренции в эволюции генетически полиморфных популяций клубеньковых бактерий // Генетика. – 1998. – Т. 34, № 12. – С. 1712-1719.
- [11] Проворов Н.А. Эволюция микробно-растительных симбиозов: филогенетические, популяционно-генетические и селекционные аспекты: Автореф. дис. ... д.б.н. – СПб., 2009. – 74 с.
- [12] Leung K., Strain S. R., de Brujin F. J., Bottomley P. J. Genotypic and phenotypic comparisons of chromosomal types within an indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifoli* // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – Vol. 60. – Р. 416-426.
- [13] Leung K., Wanjage F. N., Bottomley P. J. Symbiotic characteristics of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifoli* isolates which represent major and minor nodule-occupying chromosomal types in field grown subclover (*Trifolium subterraneum* L.) // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – Vol. 60. – Р. 427-433.
- [14] del Papa M.F., Balague L. J., Sowinski S.C. et al. Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia in acid soils of Central Argentina and Uruguay // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – Vol. 65. – Р. 1420-1427.
- [15] Федоров С.Н., Симаров Б.В. Получение мутантов с измененными симбиотическими свойствами у *Rhizobium meliloti* под действием УФ-лучей // С.-х. биология. – 1987. – № 9. – С. 44-49.
- [16] Broughton W.J., Perret X. Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses // Current Opinion in Plant Biology. – 1999. – Vol. 2. – Р. 305-311.
- [17] Broughton W.J., Jabbouri S., Perret X. Keys to symbiotic harmony // J. Bacteriol. – 2000. – Vol. 182, N 20. – Р. 5641-5652.
- [18] Triplett E.W. Isolation of genes involved in nodulation competitiveness from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifoli* T24 // PNAS. – 1988. – Vol. 85, N 1. – Р. 1-5.
- [19] Zdor R.C., Pueppke S.G. Nodulation competitiveness of Tn5-induced mutants of *Rhizobium fredii* 208 that are altered in motility and extracellular polysaccharide production // Can. J. Microbiol. – 1991. – Vol. 37. – Р. 52-58.
- [20] Bhagwat A.A., Keister D.L. Identification and cloning of *Bradyrhizobium japonicum* genes expressed strain selectively in soil and rhizospores // Appl. Environ. Microbiol. 1992. – Vol. 58, N 5. – Р. 1490-1495.
- [21] Melor H.Y., Glenn A.R., Arwas R., Dilworth M.J. Symbiotic and competitive properties of motility mutants of *Rhizobium trifoli* TA1 // Arch. Microbiol. – 1987. – Vol. 148. – Р. 34-39.
- [22] Caetano-Anolles G., Wall L.G., De Michelis A.T. et al. Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti* // Plant Physiol. 1988. – Vol. 86. – Р. 1228-1235.
- [23] Caetano-Anolles G., Crist-Estes D.K., Bauer W.D. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes // J. Bacteriol. – 1988. – Vol. 170. – Р. 3164-3169.
- [24] Hahn M., Studer D. Competitiveness of a Nif *Bradyrhizobium japonicum* mutant against the wild-type strain // FEMS Microbiol. Lett. – 1986. – Vol. 33, N 1. – Р. 143-148.
- [25] Wang D., Yang S., Tang F., Zhu H. Symbiosis specificity in the legume: rhizobial mutualism // Cell Microbiol. – 2012. – N 14(3). – Р. 334-42.
- [26] Ovtysna AO, Staehelin C. Bacterial signals required for the *Rhizobium-legume* symbiosis. In: Pandalai SG. (ed) Recent Research Developments in Microbiology. – 2003. – Vol. 7 (Part II). Trivandrum, India: Research Signpost. – Р. 631-648.
- [27] Кожемяков А.П., Белоброва С.Н., Орлова А.Г. Создание и анализ базы данных по эффективности микробных биопрепараторов комплексного действия // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – № 3. – С. 112-115.
- [28] Турик Е.Н. Разработка приемов выращивания сои в Крыму с использованием различных штаммов клубеньковых бактерий: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. – Херсон, 2006. – 16 с.
- [29] Картыжкова Л.Е. Отбор конкурентоспособных и эффективных местных штаммов *Rhizobium galegae* // Труды БГУ. – 2010. – Т. 4, вып. 2.
- [30] Фомичев Е.Е., Козлова С.Е., Чугай Т.Г. Эффективность различных штаммов клубеньковых бактерий люцерны, клевера и гороха на серых лесных почвах Томской области // Вестник ТТПУ. Сер. Естественные науки. – 2000. – Вып. 9(25). – С. 22-24.
- [31] Саданов А.К., Курманбаев А.А., Шорбаев Е.Ж. Штамм клубеньковых бактерий *Rhizobium meliloti* Л -5-1, предназначенный для получения бактериального удобрения под люцерну: Предварительный патент №18984 от 18.12.2007.
- [32] Амелин А.В. Биологический потенциал гороха и его реализация на разных этапах развития культуры // Селекция и семеноводство. – 1999. – № 2-3. – С. 15-21.

- [33] Балашов В.В., Хабаров М.А., Балашов А.В. Важный прием в технологии возделывания гороха // Волгоградский фермер. – 4.05.13. – 5 с.
- [34] Савиных А.А., Колоколова Н.Н., Боме Н.А. Эффективность инокуляции гороха посевного клубеньковыми бактериями в северной лесостепи Тюменской области // Современные научно-исследовательские технологии. – 2007. – № 2 – С. 69-70.
- [35] Шорбаев Е.Ж. Изучение влияния нитрагинизации семян зернобобовых культур в условиях Северного Казахстана // Научно-агрономический журнал. – Волгоград, 2010. – № 1 (86). – С. 31-36.

REFERENCES

- [1] Beresteckij O.A., Dorosinskij L.M., Kozhemjakov A.P. The effectiveness of preparations of nodule bacteria in Experimental Geography Network. *AN SSSR, ser. biol.*, 1987, 5, p. 670-679. (in Russ.).
- [2] Fisher H.M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.*, 1994, 58, 352-386. (in Eng.).
- [3] Provorov N.A., Vorob'ev N.I. The role of horizontal gene transfer in the evolution of nodule bacteria sent by plant-owner. *Usp. sovр. biol.*, 2010, p.336-345. (in Russ.).
- [4] Kozhemjakov A.P., Tihonovich I.A. Use of inoculum bacteria and biological products for integrated actions in agriculture. *Dokl. RASHN*, 1998, 6, p. 7-10. (in Russ.).
- [5] Vjens K. Symbiotic nitrogen fixation in legumes: agricultural aspects. Rhizobiaceae. Molecular biology of bacteria interacting with plants. Ed. Spaynka G., A. Kondorosi, P. Hukas. SPb.: *Biont.*, 2002, p. 541-564. (in Russ.).
- [6] Provorov N.A. Symbiotrophic ratio and autotrophic nitrogen supply from leguminous plants: genetics and breeding aspects. *Fiziol. Rastenij*, 1996, 43, 1, p. 127-135. (in Russ.).
- [7] Richardson D.M., Allsopp N., d'Antonio C.M. et al. Plant invasions – the role of mutualisms *Biol. Rev.*, 2000, 75, 65-93. (in Eng.).
- [8] Bena G., Lyet A., Huguet T., Olivieri I. Medicago – Sinorhizobium symbiotic specificity evolution and the geographic expansion of Medicago. *J. Evol. Biol.*, 2005, 18, 1547-1558. (in Eng.).
- [9] Perez-Ramirez N.O., Rogel M.A., Wang E. et al. Seeds of Phaseolus vulgaris bean carry Rhizobium etli FEMS *Microbiol. Ecol.*, 1998, 26, 289-296. (in Eng.).
- [10] Provorov N. A., Vorob'ev N. I. Interstrain role of competition in the evolution of genetically polymorphic populations of nodule bacteria. *Genetika*, 1998, 34, 12, p.1712-1719. (in Russ.).
- [11] Provorov N.A. Evolution of microbial-plant symbioses: phylogenetic, population genetic and selection aspects: *autoref. dis. d.b.s. St-Peterburg*, 2009, 74p. (in Russ.).
- [12] Leung K., Strain S. R., de Brujin F. J., Bottomley P. J. Genotypic and phenotypic comparisons of chromosomal types within an indigenous soil population of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 60, 416-426. (in Eng.).
- [13] Leung K., Wanjage F. N., Bottomley P. J. Symbiotic characteristics of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii isolates which represent major and minor nodule-occupying chromosomal types in field grown subclover (*Trifolium subterraneum* L.) *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 60, 427-433. (in Eng.).
- [14] del Papa M.F., Balague L. J., Sowinski S.C. et al. Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia in acid soils of Central Argentina and Uruguay *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65, 1420-1427. (in Eng.).
- [15] Fedorov S.N., Simarov B.V. Obtaining mutants with altered properties in symbiotic Rhizobium meliloti UV-rays. *S.-h. biologija*, 1987, 9, p.44-49. (in Russ.).
- [16] Broughton W.J., Perret X. Genealogy of legume-Rhizobium symbioses *Current Opinion in Plant Biology*, 1999, 2, 305-311. (in Eng.).
- [17] Broughton W.J., Jabbouri S., Perret X. Keys to symbiotic harmony *J. Bacteriol.*, 2000, 182, 20, 5641-5652. (in Eng.).
- [18] Triplett E.W. Isolation of genes involved in nodulation competitiveness from Rhizobium leguminosarum bv. trifolii T24 PN4S. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, 85, 1, 1-5. (in Eng.).
- [19] Zdor R.C., Pueppke S.G. Nodulation competitiveness of Tn5-induced mutants of Rhizobium fredii 208 that are altered in motility and extracellular polysaccharide production *Can. J. Microbiol.*, 1991, 37, 52-58. (in Eng.).
- [20] Bhagwat A.A., Keister D.L. Identification and cloning of Bradyrhizobium japonicum genes expressed strain selectively in soil and rhizosphere *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, 58, 5, 1490-1495. (in Eng.).
- [21] Melor H.Y., Glenn A.R., Arwas R., Dilworth M.J. Symbiotic and competitive properties of motility mutants of Rhizobium trifolii TA1 *Arch. Microbiol.*, 1987, 148, 34-39. (in Eng.).
- [22] Caetano-Anolles G., Wall L.G., De Micheli A.T. et al. Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by Rhizobium meliloti *Plant Physiol.*, 1988, 86, 1228-1235. (in Eng.).
- [23] Caetano-Anolles G., Crist-Estes D.K., Bauer W.D. Chemotaxis of Rhizobium meliloti to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes *J. Bacteriol.*, 1988, 170, 3164-3169. (in Eng.).
- [24] Hahn M., Studer D. Competitiveness of a Nif- Bradyrhizobium japonicum mutant against the wild-type strain FEMS *Microbiol. Lett.*, 1986, 33, 1, 143-148. (in Eng.).
- [25] Wang D., Yang S., Tang F., Zhu H. Symbiosis specificity in the legume: rhizobial mutualism *Cell Microbiol.*, 2012, 14(3), 334-42. (in Eng.).
- [26] Ovtysna AO, Staehelin C. Bacterial signals required for the Rhizobium-legume symbiosis. In: Pandalai SG. (ed) Recent Research Developments in Microbiology- Vol 7 (Part II). Trivandrum, India: *Research Signpost*, 2003, 631-648. (in Eng.).
- [27] Kozhemjakov A.P., Belobrova S.N., Orlova A.G. Creating and database analysis on the effectiveness of microbial inoculants complex action. *Sel'skohozjajstvennaja biologija*, 2011, 3, 112-115. (in Russ.).
- [28] Turin E.N. The development of methods of cultivation of soybeans in the Crimea using different strains of nodule bacteria: *autoref... dis... cand. Agr.sc.*, Herson, 2006, - 16p. (in Russ.).

- [29] Kartyzhova L.E. The selection of competitive and efficient local strains of Rhizobium galegae. Works of BGU, **2010**, 4, 2. (in Russ.).
- [30] Fomichev E.E., Kozlova S.E., Chugaj T.G. Effectiveness of different strains of nodule bacteria of alfalfa, clover and peas on gray forest soils of the Tomsk region. *Vestnik TGPU*, **2000**, 9(25), Ser. Estestvennye nauki, p. 22-24. (in Russ.).
- [31] Sadanov A.K., Kurmanbaev A.A., Shorabaev E.Zh. The strain of nodule bacteria Rhizobium meliloti L -5-1 intended for bacterial fertilizer for alfalfa: provisional patent №18984 from **18.12.2007**. (in Russ.).
- [32] Amelin A.V The biological potential of pea and its implementation at different stages of development of culture. Selection and seed, **1999**, p. 2-3, p. 15-21. (in Russ.).
- [33] Balashov V.V., Habarov M.A., Balashov A.V. An important technique in the technology of cultivation of peas // Volgograd farmer, **4.05.13**, 5 p. (in Russ.).
- [34] Savinyh A.A., Kolokolova N.N., Bome N.A. The effectiveness of the inoculation of pea rhizobia in northern forest-steppe of the Tyumen region. Modern high technologies, **2007**, 2, p. 69-70. (in Russ.).
- [35] Shorabaev E.Zh. Study of the influence of nitrogenation on seed legumes in the conditions of Northern Kazakhstan. Scientific Agronomy Journal. Volgograd, 2010, 1 (86), p. 31-36. (in Russ.).

БҮРШАҚ ТҮҚЫМДАС ДАҚЫЛДАРДЫҢ ӨНІМДІЛІГІН АРТТАРУҒА ЖӘНЕ ТОПЫРАҚТЫ БИОЛОГИЯЛЫҚ АЗОТПЕН БАЙЫТУ ҮШИН БИОПРЕПАРАТТАРДЫҢ ҚҰРАМЫНА КІРЕТИН ТҮЙНЕК БАКТЕРИЯЛАРЫНЫң ШТАМДАРЫН ИРІКТЕУДІҢ КРИТЕРИЙЛЕРІ

А. К. Саданов¹, Н. Н. Гаврилова¹, Т. Н. Дадонова², И. А. Ратникова¹

¹КР БФМ FK «Микробиология және вирусология институты» РМК , Алматы, Қазақстан

²«Парасат» АҚ, Астана, Қазақстан

Тірек сөздер: түйнек бактериялары, бұршақ түқымдас өсімдіктер, симбиоз, бәсекелестік, вируленттілік, нитрогеназдық белсенділік, үйлестірілген селекция.

Аннотация. Түйнек бактерияларының негізінде тиімділігі жоғары биопрепараттарды даярлау үшін сінірлелін азотты, толығымен өсімдік сорттарының өсуіне және жоғары өнім түзуге пайдаланатын, азот сініру белсенділігі жоғары ризобий штамдарының комбинациясын алуға бағытталған, өзара үйлестірілген селекция қажет. Мұнда нитрогеназа белсенділігінің көрсеткіші, белсенділігі төмен штамдарды алып тасталуына байланысты, ризобий селекциясының ең алғашқы сатысында пайдалырақ. Бұдан ары қарайға зерттеулерде өсімдік бойында азоттың жинақталуына әсер ету қабылеті бойынша, олардың массасын корреляциялайтын симбиоздың ең жоғарғы тиімділігі бар генотипін анықтау үшін, ризобий селекциясы нәтижеліле болып табылады.

Штамдар арасындағы бәсекелестікке микробтар мен өсімдіктердің қорек көздеріне тапшылығы әсер етеді, сонымен катар топырактың қасиеттері де – ылғалдылық, қышқылдық, температура, құрылымы, органикалық заттардың құрамы.

Биотикалық факторлардың ішінде жергілікті микроорганизмдердің таралу түрлері мен қасиеттері ерекше маңызды, оның ішінде жыртқыш қарапайымдар, өздігінен реттеуши эффектісінің болуына байланысты, түйнек түзу жылдамдығы, экзополисахаридтер синтезі, инокуломді қолдану әдістері және бактериялардың қозғалғыштыбы.

Түйнек бактериялары мен өсімдіктердің өзара әсер ету механизмдерін талдап зерттеу – өндірістік штамдардың бәсекелестігін арттыру мақсатында, сонымен катар егістік жағдайында симбиотикалық азот сініруде өте жоғары тиімділікке қол жеткізу үшін штамм-сортының едәуір арнайы комбинациясын жасауға мүмкіндік береді.

Поступила 27.02.2015 г.