

9. Сорокин О.Д. Прикладная статистика на компьютере. – Краснообск: ГУП РПО СО РАСХН, 2009. – 222 с.

References

1. Chulkina V.A., Toropova E.Yu., Stetsov G.Ya. Ekologicheskie osnovy integrirovanoi zashchity rastenii / Pod red. M.S. Sokolova i V.A. Chulkinoi. – M.: Kolos, 2007. – 568 s.

2. Kryukova E.A., Malanina Z.I., Kolmukidi S.V. Rol' sornoi travyanistoi i drevesnokustarnokovoi rastitel'nosti v infektsionnykh protsessakh agrarnykh i agrolesnykh landshaftov // Zashchita i karantin rastenii. – 2011. – № 4. – S. 20-23.

3. Toropova E.Yu., Zakharov A.F., Selyuk M.P. Vredonosnost' i rasprostranennost' zlakovykh sornyakov v posevakh yarovoi pshe-nitsy v Novosibirskoi oblasti // Agrotekhnicheskii metod zashchity rastenii ot vrednykh organizmov. Mater. V Mezhdunar. nauchn.-prakt. konf. 13-16 iyunya 2011 g. Kubanskii GAU. – Krasnodar, 2011. – S. 238-241.

4. Blackshaw R.E. Tillage intensity affects weed communities in agroecosystems // Invasive Plants: Ecological and Agricultural Aspects.

– Switzerland: Burkhauser Verlag, 2005. – P. 209-221.

5. Toropova E.Yu., Kazakova O.A., Vorob'eva I.G., Selyuk M.P. Fuzarioznye kornevye gnili zernovykh kul'tur v Zapadnoi Sibiri i Zaural'e // Zashchita i karantin rastenii. – № 9. – 2013. – S. 23-26.

6. Schroeder K.L., Paulitz T.C. Root Diseases of Wheat and Barley During the Transition from Conventional Tillage to Direct Seeding // Plant Disease. – September, 2006. – P.1247-1253.

7. Pridannikova E.B., Toropova E.Yu. Rol' sornykh rastenii kak rezervatorov vzbuditelei kornevykh gnilei // Nasledie N.I. Vavilova v razvitii biologicheskikh i sel'skokhozyaistvennykh nauk: Mater. mezhdunar. nauchn.-praktich. konf. – Kurgan, 2012. – S. 220-223.

8. Chulkina V.A., Toropova E.Yu., Stetsov G.Ya. Integrirovannaya zashchita rastenii: fitosanitarnye sistemy i tekhnologii / Pod red. M.S. Sokolova i V.A. Chulkinoi. – M.: Kolos, 2009. – 670 s.

9. Sorokin O.D. Prikladnaya statistika na komp'yutere. – Krasnoobsk, GUP RPO SO RASKhN, 2009. – 222 s.



УДК 631.847.211:633.34

Д.В. Крутило  
D.V. Krutilo

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ШТАММОВ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* НА ФОНЕ МЕСТНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ РИЗОБИЙ СОИ**

**EFFECTIVENESS OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* STRAINS AGAINST THE BACKGROUND OF LOCAL POPULATIONS OF SOYBEAN RHIZOBIA**

**Ключевые слова:** *B. japonicum* 46, *B. japonicum* М8, биопрепарат, клубеньковые бактерии, конкурентоспособность, эффективный штамм, Ризобифит, соя.

Важную роль в формировании высоких урожаев сои играют специфические клубеньковые бактерии, вступающие в симбиоз с растением. Представлены результаты исследований по применению активных штаммов *Bradyrhizobium japonicum* для инокуляции сои на фоне местных популяций ризобий сои. Объектами исследования служили штаммы *B. japonicum* 46 и *B. japonicum* М8, антисыворотки 46, М8, 634Б и KB11, а также растения сои сорта Устя. Симбиотические свойства и конкурентоспособность штаммов клубеньковых бактерий сои изучали в вегетационных и полевом опытах на фоне различных популяций специфических ризобий. Нами изучены особенности взаимодействия активных штаммов *B. japonicum* 46 и *B. japonicum* М8 с соей на фоне местных

популяций специфических ризобий. Показано, что абсолютное доминирование в клубеньках интродуцируемого штамма не всегда имеет принципиальное значение для увеличения урожайности. На фоне почвенных популяций клубеньковых бактерий наиболее эффективные симбиотические системы сои формируются не с одним, а с несколькими комплементарными, хотя и серологически отличными штаммами ризобий одного вида. Установлено, что наиболее активным симбиотическим азотфиксатором является штамм *B. japonicum* 46. Как биоагент препарата «Ризобифит» этот штамм способен выдерживать конкуренцию с представителями моно- и полиштаммовых популяций местных ризобий сои, обеспечивая стабильное увеличение надземной массы растений на 12,9-18,5% и повышение урожая зерна – на 17,0% относительно контроля. На штамм *B. japonicum* 46 получен патент Украины, который предложено использовать в производстве биопрепаратов для повышения урожайности сои.

**Keywords:** *B. japonicum* 46, *B. japonicum* M8, biological fertilizer, nodule bacteria, competitiveness, efficient strain, Rizobifit, soybean.

Specific nodule bacteria that establish a symbiotic relationship with plants play a significant role in achieving high soybeans yields. The paper presents the results of investigations concerning the application of *Bradyrhizobium japonicum* active strains for soybean inoculation against the background of local populations of soybean rhizobia. The following was investigated: *B. japonicum* strains 46 and M8; antisera 46, M8, 634b and KV11; and soybean plants of Ustyia variety. Symbiotic properties and competitive ability of strains of soybean nodule bacteria were studied under the conditions of greenhouse and field trials within different populations of specific rhizobia. We studied the peculiarities of interaction of *B. japonicum* active strains 46 and *B. japonicum*

active strains M8 with soybeans against the background of local populations of specific rhizobia. It is shown that the absolute domination of introduced strain in nodules is not always crucial for increasing crop yields. Against the background of soil populations of nodule bacteria the most effective symbiotic soybean systems are formed not by one, but by several complementary parts although serologically different rhizobia strains of one species. It is found that the *B. japonicum* 46 is the most active symbiotic nitrogen fixer. As a biological agent of Rizobifit this strain is able to stand competition with mono- and multi-strain local populations of soybean rhizobia and to provide constant increase of above-ground plant herbage by 12.9%-18.5% and bean harvest by 17.0% as compared to the control. A patent of Ukraine for *B. japonicum* 46 was obtained and it is proposed to be used in the production of biological fertilizers to increase soybean yields.

**Крутило Дмитрий Валериевич** – к.б.н., с.н.с., зав. сектором биологического азота, лаб. растительно-микробных взаимодействий, Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН Украины, г. Чернигов, Украина. Тел. 067-359-3515. E-mail: krutilod@mail.ru.

**Krutilo Dmitriy Valeriyevich**, Cand. Agr. Sci., Senior Staff Scientist, Lab. of Plant-Microbial Interactions, Institute of Agricultural Microbiology and Agricultural Industry Production of Natl. Acad. of Agr. Sci., Chernigov, Ukraine. Ph.: 067-359-3515. E-mail: krutilod@mail.ru.

### Введение

На сегодняшний день самой распространенной зернобобовой культурой мирового земледелия является соя (*Glycine max* (L.) Merr.). Важную роль в формировании высоких урожаев этой культуры играют клубеньковые бактерии (ризобии), вступающие в симбиоз с растением и обеспечивающие его биологическим азотом [1]. В современных технологиях выращивания сои широко используются биопрепараты на основе высокоэффективных штаммов специфических ризобий. Одним из таких биопрепаратов, предназначенных для повышения урожайности сои, является разработанный в Украине препарат «Ризобифит» (ТУ У 319.00494456-006:2002).

Известно, что обработка семян бобовых культур микробными препаратами способствует формированию в почвах местных популяций клубеньковых бактерий. Однако представители этих популяций, утратив способность к азотфиксации, могут выступать одним из лимитирующих факторов эффективного применения биопрепаратов [2, 3]. Встречающиеся в литературе данные по изучению эффективности инокуляции бобовых растений на фоне почвенных популяций ризобий достаточно противоречивы.

Учитывая вышесказанное, цель наших исследований – изучить особенности взаимодействия активных штаммов *Bradyrhizobium japonicum* с соей на фоне местных популяций специфических ризобий.

### Объекты и методы исследований

Объекты исследования: штаммы *B. japonicum* 46, *B. japonicum* M8; антисыворотки к штаммам *B. japonicum* 46, M8, 634b и KV11, а также растения сои сорта Устя. Исследуемые штаммы хранятся в Коллекции полезных почвенных микроорганизмов Института сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН (ИСМАП НААН, Украина, г. Чернигов).

Симбиотические свойства штаммов клубеньковых бактерий сои изучали в вегетационных и полевом опытах на фоне моно- и полиштаммовых популяций специфических ризобий. Вегетационные опыты проводили на дерново-подзолистой супесчаной почве. Семена обрабатывали ризобифитом (жидкая форма) на основе штаммов *B. japonicum* 46 и *B. japonicum* M8 из расчета 200-300 бактериальных клеток на 1 семя. Повторность опытов 5-8-кратная. Полевой опыт проводили на темно-серой почве опытного участка ИСМАП НААН. Повторность опыта 4-кратная. Площадь учетной делянки – 6 м<sup>2</sup>. Размещение делянок рендомизированное.

Конкурентоспособность штаммов (отношение количества образованных штаммом клубеньков к общему количеству клубеньков, выраженное в процентах) определяли в реакции агглютинации методом Груббера-Видаля [4]. В качестве антигена использовали гомогенаты клубеньков (50 шт. из каждого варианта). Поликлональные О-антисыворотки к штаммам ризобий сои получали по методике ВНИИСХМ в нашей модификации [5].

Активность азотфиксации определяли ацетиленовым методом на газовом хроматографе Chrom-4. Математическую обработку данных осуществляли по методике Б.О. Доспехова [6], а также использовали программу Statistica 7.0.

**Результаты и их обсуждение**

В вегетационном опыте изучали эффективность биопрепарата «Ризобифит» на основе активных штаммов *V. jarońicum* 46 и *V. jarońicum* M8. Опыт проводили на дерново-подзолистой почве, отобранной через год после выращивания сои, инокулированной стандартным штаммом *V. jarońicum* 6346.

Анализ полученных данных свидетельствует, что на корнях контрольных растений (без инокуляции) сформировалось значительное количество клубеньков (32 шт/раст.) (табл. 1). Серологический анализ гомогенатов этих клубеньков показал, что все они образованы одним, ранее интродуцированным в почву, штаммом *V. jarońicum* 6346 (рис. 1).

Обработка семян сои Ризобифитом способствовала увеличению количества клубеньков в 1,2-1,5 раза. Максимальным этот показатель был в варианте с инокуляцией штаммом *V. jarońicum* 46 (48 шт/раст.). Сероло-

гическая идентификация клубеньков показала, что на фоне моноштаммовой почвенной популяции ризобий сои наиболее конкурентоспособным оказался штамм *V. jarońicum* 46. Он обнаружен в 79,2% клубеньков, тогда как штамм *V. jarońicum* M8 выявлен в 62,5% клубеньков (рис. 1). Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что при инокуляции сои активными штаммами наблюдаются существенные изменения в «клубеньковой» популяции ризобий. В результате этих изменений снижается количество клубеньков, образованных местными ризобиями, а интродуцированные штаммы занимают доминирующее положение, что служит критерием их высокой конкурентоспособности.

В вариантах с инокуляцией также отмечено существенное увеличение массы клубеньков (в 1,2-1,3 раза) и их нитрогеназной активности (в 1,2-2,0 раза) относительно контроля. Сравнительный анализ всех симбиотических показателей показал, что наиболее активным симбионтом сои на фоне моноштаммовой популяции местных ризобий оказался штамм *V. jarońicum* 46. В этом варианте отмечено достоверное увеличение продуктивности растений на 18,5% в сравнении с контролем и на 3,7% в сравнении со штаммом *V. jarońicum* M8.

Таблица 1

**Влияние инокуляции семян биопрепаратом «Ризобифит» на симбиотические показатели сои сорта Устья (вегетационный опыт)**

Варианты опыта	Количество клубеньков, шт/раст.	Масса клубеньков, г/раст.	Активность азотфиксации, мкг N <sub>2</sub> /раст/ч	Содержание сухого вещества в надземной массе растений, г/раст.
Без инокуляции (контроль)	32,00	0,22	3,65	1,19
Ризобифит ( <i>V. jarońicum</i> M8)	37,07	0,27	4,51	1,36
Ризобифит ( <i>V. jarońicum</i> 46)	48,07	0,29	7,23	1,41
HCP <sub>05</sub>	4,02	0,02	0,61	0,05

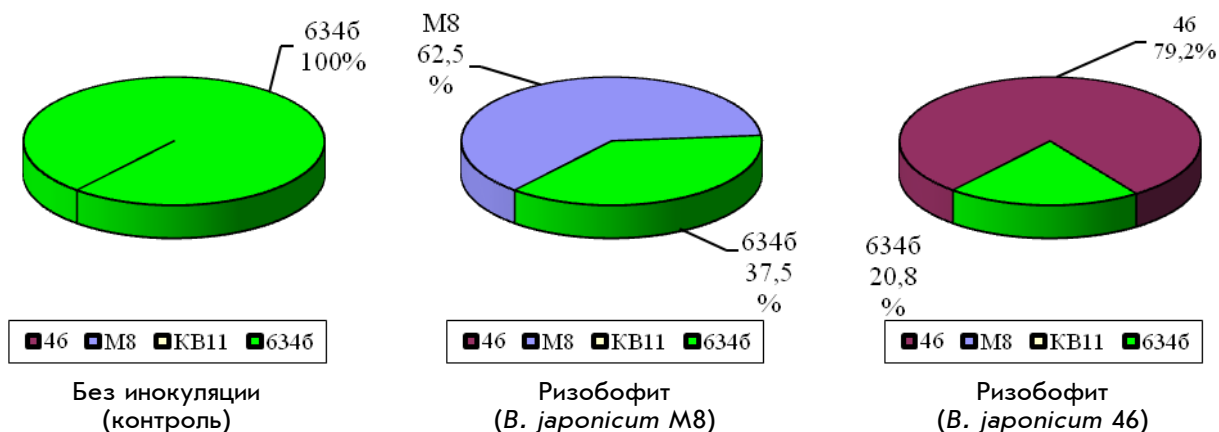


Рис. 1. Конкурентоспособность штаммов клубеньковых бактерий сои – биоагентов препарата «Ризобифит» (вегетационный опыт)

Следующим этапом наших исследований было оценить эффективность штаммов *B. japonicum* 46 и *B. japonicum* М8 на фоне многочисленной популяции микросимбионтов сои, присутствующей в почве. Эта популяция была сформирована при периодическом (в течение 10 лет) выращивании сои, инокулированной различными штаммами.

Анализ в реакции агглютинации гомогенатов клубеньков контрольного варианта показал, что местная популяция ризобий сои представлена бактериями, относящимися к серогруппам 46, М8 и КВ11 в соотношении 14,6; 2,1 и 68,7% соответственно (рис. 2). Кроме того, в почве выявлены ризобии, не реагирующие с использованными антисыворотками, которые отнесены к серогруппе X (14,6%).

На фоне такой полиштаммовой популяции клубеньковых бактерий инокуляция сои Ризобифитом способствовала увеличению количества клубеньков на 26,3-27,6% в сравнении с контролем (табл. 2). Причем штаммы-инокулянты существенно влияли на процесс инфицирования растений местными ризобиями (рис. 2). Так, при обработке сои штаммами *B. japonicum* 46 и *B. japonicum* М8 число клубеньков, образованных доминирующими в почве бактериями серогруппы КВ11, уменьшалось с 68,7% в контроле до 42,2-56,3% в вариантах с инокуляцией. Следует

отметить, что штамм *B. japonicum* 46 оказался более конкурентоспособным и при наличии в почве многочисленной популяции местных ризобий, формируя значительное количество клубеньков (42,2%). Штамм *B. japonicum* М8 обнаружен только в 22,9% клубеньков.

Кроме того, использование штамма *B. japonicum* 46 способствовало достоверному увеличению массы клубеньков (с 0,30 в контроле до 0,36 г/раст. в варианте с инокуляцией).

Проведенные исследования показали, что в вариантах с инокуляцией сои ризобифитом уровень азотфиксирующей активности был выше в 1,2-1,4 раза, чем в контроле (табл. 2). Лучшим азотфиксатором оказался штамм *B. japonicum* 46. Количество фиксированного азота при инокуляции этим штаммом составило 42,38 мкг N/раст/ч.

Как результат эффективного взаимодействия исследуемых штаммов с растением в вариантах с инокуляцией отмечено увеличение надземной массы сои на 8,6-12,9% по сравнению с контролем (табл. 2). Максимальным этот показатель (1,58 г/раст.) был при инокуляции сои штаммом *B. japonicum* 46, более низким (1,52 г/раст.) – при использовании штамма *B. japonicum* М8.

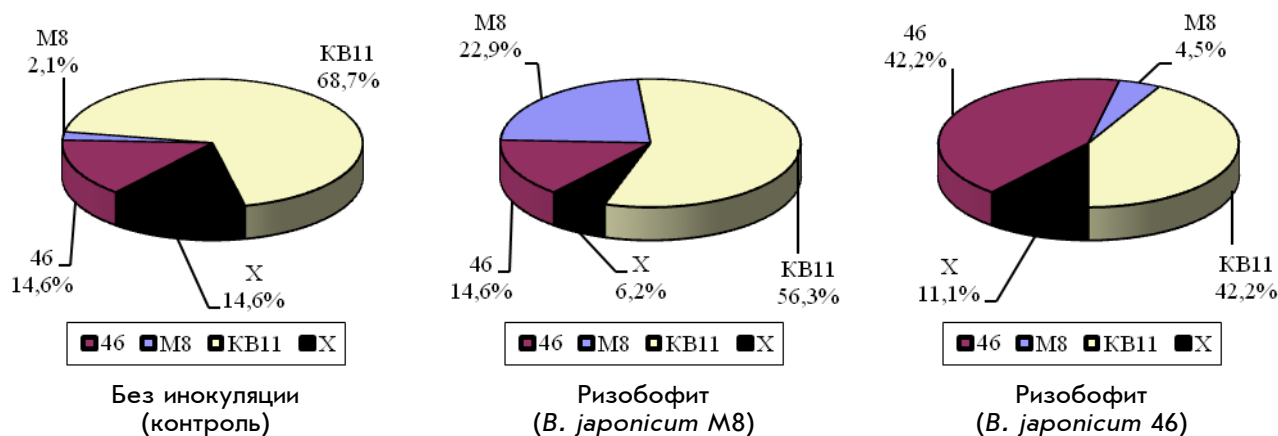


Рис. 2. Конкурентоспособность штаммов клубеньковых бактерий сои – биоагентов препарата «Ризобифит» (вегетационный опыт)

Таблица 2

**Влияние инокуляции семян биопрепаратом «Ризобифит» на симбиотические показатели сои сорта Устя (вегетационный опыт)**

Варианты опыта	Количество клубеньков, шт/раст.	Масса клубеньков, г/раст.	Активность азотфиксации, мкг N <sub>2</sub> /раст/ч	Содержание сухого вещества в надземной массе растений, г/раст.
Без инокуляции (контроль)	36,79	0,30	30,68	1,40
Ризобифит ( <i>B. japonicum</i> М8)	46,96	0,32	36,42	1,52
Ризобифит ( <i>B. japonicum</i> 46)	46,46	0,36	42,38	1,58
НСР <sub>05</sub>	3,43	0,03	3,33	0,06

Анализ результатов серологического исследования клубеньков и данных по продуктивности растений позволяет предположить, что абсолютное доминирование в клубеньках интродуцируемого штамма не всегда имеет принципиальное значение для увеличения урожайности. Возможно, что штамм-инокулянт не только сам активно инфицирует растение, но и является своеобразным активатором местной популяции клубеньковых бактерий, что способствует формированию эффективной симбиотической системы сои с несколькими комплементарными, хотя и серологически отличными штаммами ризобий одного вида.

Следующим этапом нашей работы было изучить конкурентоспособность и симбиотические свойства штаммов *V. jaronicum* 46 и *V. jaronicum* M8 в полевых условиях.

В течение вегетационного периода на корнях контрольных растений количество клубеньков не превышало 2-3 шт/раст., что свидетельствует о наличии в почве немногочисленной популяции ризобий сои (табл. 3). Серологический анализ гомогенатов клубеньков показал, что они образованы клубеньковыми бактериями сои, относящимися к одной серогруппе M8 (рис. 3).

На фоне моноштаммовой почвенной популяции штаммы *V. jaronicum* 46 и *V. jaronicum* M8 способствовали значительному увеличению количества клубеньков в сравнении с вариантом без инокуляции (табл. 3). Оба штамма формировали одинаковое количество клубеньков с одинаковой массой.

Установлено, что интродукция штамма *V. jaronicum* 46 заметно влияет на процесс формирования клубеньков местными ризобиями (табл. 3). В этом варианте отмечено существенное уменьшение (до 14,6 %) количества клубеньков, образованных штаммом *V. jaronicum* M8, сапрофитно существующим в почве. То есть при наличии в почве немногочисленной популяции ризобий сои интродуцированный штамм доминировал в клубеньках (85,4%), что подтверждает его способность конкурировать с местными клубеньковыми бактериями.

Показано, что во всех вариантах с инокуляцией активность азотфиксации была значительно выше (в 1,7-2,5 раза) в сравнении с контролем. Максимальный уровень азотфиксирующей активности наблюдался в варианте с применением ризобифита на основе штамма *V. jaronicum* 46 (10,65 мкг N<sub>2</sub>/раст/ч).

Таблица 3

Влияние инокуляции семян биопрепаратом «Ризобифит» на симбиотические показатели сои сорта Устя (полевой опыт, 2013 г.)

Варианты опыта	Количество клубеньков, шт/раст.		Масса клубеньков, г/раст.		Активность азотфиксации, мкг N <sub>2</sub> /раст/ч	
	Фаза роста					
	цветение	налив бобов	цветение	налив бобов	цветение	налив бобов
Без инокуляции (контроль)	1,58	2,75	0,05	0,15	1,09	4,34
Ризобифит ( <i>V. jaronicum</i> M8)	5,42	9,50	0,12	0,25	6,04	7,44
Ризобифит ( <i>V. jaronicum</i> 46)	5,33	9,33	0,14	0,25	5,26	10,65
HCP <sub>05</sub>	1,12	2,20	F <sub>Ф</sub> < F <sub>05</sub>	0,07	1,46	2,26

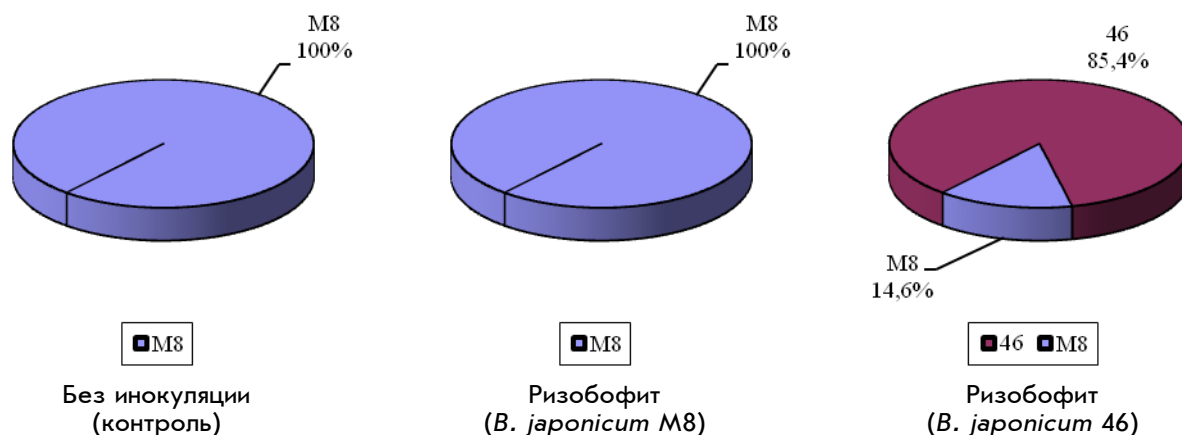


Рис. 3. Конкурентоспособность штаммов клубеньковых бактерий сои – биоагентов препарата «Ризобифит» (полевой опыт, 2013 г.)

Влияние инокуляции клубеньковыми бактериями на семенную продуктивность сои сорта Устя (полевой опыт, 2013 г.)

Варианты опыта	Урожайность, т/га	Прирост урожая, %
Без инокуляции (контроль)	2,23	100,0
Ризобифит ( <i>B. japonicum</i> М8)	2,53	13,4
Ризобифит ( <i>B. japonicum</i> 46)	2,61	17,0
НСР <sub>05</sub>	0,16	

При инокуляции семян сои активными штаммами клубеньковых бактерий урожайность культуры увеличивалась на 13,4-17,0% (табл. 4). Следует отметить, что, несмотря на наличие в почве местных клубеньковых бактерий серогруппы М8, интродукция активного штамма этой же серогруппы (*B. japonicum* М8) способствовала формированию более активной симбиотической системы и существенному увеличению урожайности сои. Максимальный прирост урожая к контролю (17,0%) получен при использовании высокоэффективного штамма *B. japonicum* 46. На этот штамм получен патент Украины на изобретение [7].

#### Выводы

Таким образом, нами изучены симбиотические свойства штаммов *B. japonicum* 46 и *B. japonicum* М8 как биоагентов препарата «Ризобифит». Показано, что абсолютное доминирование в клубеньках интродуцируемого штамма не всегда имеет принципиальное значение для увеличения урожайности. На фоне почвенных популяций клубеньковых бактерий наиболее эффективные симбиотические системы сои формируются не с одним, а с несколькими комплементарными, хотя и серологически отличными штаммами ризобий одного вида.

Установлено, что наиболее активным симбиотическим азотфиксатором является штамм *B. japonicum* 46. Он способен выдерживать конкуренцию с представителями моно- и полиштаммовых популяций местных ризобий сои, обеспечивая стабильное увеличение надземной массы растений на 12,9-18,5% и повышение урожая зерна – на 17,0% относительно контроля.

На штамм *B. japonicum* 46 получен патент Украины, который предложено использовать в производстве биопрепаратов для повышения урожайности сои.

#### Библиографический список

1. Бабич А.О. Сучасне виробництво і використання сої. – Київ: Урожай, 1993. – 432 с.
2. Толкачев Н.З. Потенциальные возможности симбиотической азотфиксации при выращивании сои на юге Украины // Микробиол. журн. – 1997. – Т. 59. – № 4. – С. 34–41.
3. Патица В.П., Крутило Д.В., Ковалевська Т.М. Вплив аборигенних популяцій буль-

бочкових бактерій сої на симбіотичну активність інтродукованого штаму *Bradyrhizobium japonicum* 6346 // Микробиол. журн. – 2004. – Т. 66. – № 3. – С. 14–21.

4. Кэбот Э., Мейер Б. Экспериментальная иммунология. – М.: Медицина, 1968. – 677 с.

5. Берестецкий О.А. Методические рекомендации по получению новых штаммов клубеньковых бактерий и оценке их эффективности. – Л., 1979. – 33 с.

6. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. – 352 с.

7. Штам бактерій *Bradyrhizobium japonicum* для одержання бактеріального добрива під сою: пат. 85943 України: МПК С 12 N 1/20, С 05 F 11/08 / Ковалевська Т.М., Надкернична О.В., Крутило Д.В., Горбань В.П.; заявник та патентовласник Ін-т с.-г. мікробіології УААН. – № а 2007 07156; заявл. 25.06.07; опубл. 10.03.09, Бюл. № 5. – 4 с.

#### References

1. Babych A.O. Suchasne vyrobnyctvo i vykorystannja soi'. – Kyi'v: Urozhaj, 1993. – 432 s.
2. Tolkachev N.Z. Potentsial'nye vozmozhnosti simbioticheskoi azotfiksatsii pri vyrashchivanii soi na yuge Ukrainy // Mikrobiol. zhurn. – 1997. – Т. 59. – № 4. – S. 34-41.
3. Patyka V.P., Krutylo D.V., Kovalevs'ka T.M. Vplyv aborygennyh populjacij bul'bochkovyh bakterij soi' na symbiotychnu aktyvnist' introdukovanogo shtamu Bradyrhizobium japonicum 634b // Mikrobiol. zhurn. – 2004. – Т. 66. – № 3. – S. 14-21.
4. Kebot E., Meier B. Eksperimental'naya immunologiya. – M.: Meditsina, 1968. – 677 s.
5. Berestetskii O.A. Metodicheskie rekomendatsii po polucheniyu novykh shtammov klubenkovykh bakterii i otsenke ikh effektivnosti. – L., 1979. – 33 s.
6. Dospikhov B.A. Metodika polevogo opyta. – M.: Agropromizdat, 1985. – 352 s.
7. Shtam bakterij Bradyrhizobium japonicum dlja oderzhannja bakterial'nogo dobryva pid soju: pat. 85943 Ukrai'ny: MPK S 12 N 1/20, S 05 F 11/08 / Kovalevs'ka T.M., Nadkernychna O.V., Krutylo D.V., Gorban' V.P.; zavnyk ta patentovlasnyk In-t s.-g. mikrobiologii' UAAN. – № а 2007 07156; zavavl. 25.06.07; opubl. 10.03.09, Bjul. № 5. – 4 s.