

УДК 633.853.52:576.851.155:631.5

ВИРУЛЕНТНОСТЬ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ СОИ И МАСШТАБЫ УСВОЕНИЯ СИМБИОТИЧЕСКОГО АЗОТА В ПОЧВАХ ПРИАМУРЬЯ

В.А. Тильба,

доктор биологических наук, академик РАН

ФГБНУ ВНИИМК

Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17
Тел.: (861) 275-85 11

E-mail: vniimk-zem@yandex.ru

Для цитирования: Тильба В.А. Вирулентность клубеньковых бактерий сои и масштабы усвоения симбиотического азота в почвах Приамурья // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2016. – Вып. 4 (168). – С. 61–66.

Ключевые слова: соя, вирулентность, штаммы, ризобии, симбиотическая азотфиксация.

Анализировались показатели образования клубеньков сои в лугово-черноземовидных почвах Приамурья. Определяли вирулентность аборигенных штаммов и долю использования симбиотического азота сортами Гармония и Негя 1. Для этого использовали метод сравнения с небобовой культурой (овсом) и методом сравнения исходного сорта с его же формой-мутантом, образующим незначительное количество клубеньков низкой активности. Аборигенные ризобии сои изучаемых почв характеризуются высокой вирулентностью (от 45 до 100 %) по отношению к сортам сои различного географического происхождения. Для штаммов *Bradyrhizobium japonicum* (медленнорастущие формы) пределы вирулентности по отношению к изучаемым сортам составляют от 73 до 100 % и для штаммов *Sinorhizobium fredii* (быстрорастущие формы) – 40–100 %. Доля использования симбиотического азота сортами сои Гармония и Негя 1 в изучаемых условиях различалась незначительно и составила в различные периоды вегетации 63–82 %. Оба метода определения доли использования соей симбиотического азота показали высокую сходимость: от 63–67 до 82–82 %.

UDC 633.853.52:576.851.155:631.5

Virulence of legume bacteria on soybean and degree of symbiotic nitrogen accumulation in soils of Amur River region.

Tilba V.A., doctor of biology, academician RAS

FGBNU VNIIMK

17, Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia

Tel.: (861) 275-85 11

E-mail: vniimk-zem@yandex.ru

Key words: soybean, virulence, strains, rhizobia, symbiotic nitrogen fixation.

Indicators of soybean nodules development in meadow-flood-plain soils of Amur River region were analyzed. Virulence of local strains and a share of symbiotic nitrogen accumulation by the cultivars Harmony and Nega 1 were determined. There were used a method of comparison to non-legume crop (oat) and a method of comparison of a parental cultivar to its mutant form which develops insignificant quantity of nodules with low activity. The local soybean rhizobia in studied soils are characterized with a high virulence (from 45 to 100%) to soybean cultivars of the different geographical origin. For strains of *Bradyrhizobium japonicum* (slow-growing forms) the virulence limits for studied cultivars are from 73 to 100% and for strains of *Sinorhizobium fredii* (quick-growing forms) – 40–100%. A share of symbiotic nitrogen accumulation by the cultivars Harmony and Nega 1 in studied conditions was differed insignificantly and was in the various vegetative periods 63–82%. The both methods of determination of a share of symbiotic nitrogen accumulation showed the high similarity: from 63–67 to 82–82%.

Введение. В почвах Дальнего Востока масштабы использования симбиотического азота в посевах сои достигают 50–70 % от общей потребности в элементе [4; 5].

Указанные процессы определяются взаимодействием аборигенной популяции ризобий с сортами сои преимущественно амурского происхождения. Массовое образование клубеньков на корнях сои в лугово-черноземовидных, луговых глеевых и других почвах Приамурья свидетельствует о высокой агрессивности изучаемых ризобий – их вирулентности, активности, конкурентоспособности и эффективности [2]. Вместе с тем во многом остаются неясными факторы, определяющие сортовую специфику и динамику симбиотиче-

ской азотфиксации. Исходя из этого, представлялось важным проанализировать свойства вирулентности аборигенных штаммов клубеньковых бактерий по отношению к местным и инорайонным сортам сои и определить у отдельных сортов показатели потребления симбиотического азота.

Материалы и методы. С этой целью в течение длительного времени (1980–2010 гг.) проводились исследования на лугово-черноземовидных почвах Дальнего Востока. Указанные почвы имеют гумусовый горизонт мощностью 25–30 см, содержание гумуса 4–5 %, реакция среды от слабо кислой до нейтральной, рН солевое – 5,1, сумма поглощённых оснований 25–40 мг-экв. на 100 г почвы. Содержание валового азота от 0,3 до 0,5 %, фосфора – 0,2–0,3, калия – 2–2,5 %.

Территория, на которой располагались опыты, характеризуется чертами муссонного климата. Сумма активных температур колеблется от 1700 до 2100 °С, годовое количество осадков до 600 мм. За тёплый период выпадает 300–450 мм. Распределение гидротермических ресурсов крайне неравномерно по месяцам. Продолжительность безморозного периода 120–125 дней.

Изучались сорта амурской селекции, включая Амурскую 310, Октябрь, Гармонию, Негу и ряд других.

Количество клубеньков учитывали при отборе среднего образца на экспериментальных участках по общепринятой методике в расчёте на 1 растение. Показатель вирулентности определяли по соотношению количества растений, образовавших клубеньки, в общей выборке. В лабораторных опытах вирулентность штаммов определяли при выращивании растений в ёмкостях со стерильной средой Гельригеля с уменьшенной дозой азота [8; 9; 10]. Долю использования растениями биологического азота учитывали методом Трепачева Е.П. [7] при сравнении с небобовой культурой (овсом). Одновременно этот же показатель рассчитывали мето-

дом Бегуна С.А. [3] путём сравнения содержания азота у изучаемого сорта и его мутанта-сортообразца с неэффективным симбиотическим аппаратом (скудно растущая соя).

Результаты и обсуждение. В изучаемых почвах в течение длительного естественно-исторического отрезка времени сформировалась популяция специфичных для сои клубеньковых бактерий, что явилось результатом длительной коэволюции макро- и микросимбионтов. Это подтверждается повсеместным распространением в рассматриваемом регионе диких форм сои. Изучаемые ризобии, по-видимому, обладают достаточным разнообразием свойств и разделяются на виды (*Bradyrhizobium japonicum* и *Sinorhizobium fredii*), включая кластеры, клональные и штаммовые структуры.

После масштабного расширения посевов селекционных сортов сои на Дальнем Востоке на популяцию аборигенных клубеньковых бактерий стали оказывать дополнительное давление генотипы культурных растений, включая сорта инорайонного происхождения. Естественно, что одним из наиболее информативных показателей уровня взаимоотношений партнёров симбиоза является образование клубеньков на корнях. Он характеризует вирулентность штаммов – их способность проникать в ткань корня и вызывать образование клубеньков [6]. В какой-то мере этот же показатель может характеризовать и конкурентоспособность изучаемых объектов, хотя в большей степени данный признак обусловлен, по-видимому, достаточно сложными биохимическими процессами взаимодействия партнёров симбиоза.

В соесеющем поясе Приамурья повсеместно в массовых посевах на корнях сои наблюдается образование значительного количества клубеньков, что свидетельствует об их высокой вирулентности. Вместе с тем по отношению к сортам растения-хозяина выявлены заметные отклонения. Как видно из таблицы 1, число

клубеньков не всегда зависит от места происхождения сорта. У китайского сорта Хэйхэ 1 и амурского сорта Дочь Крапинки количество клубеньков различается существенно.

Таблица 1

Влияние амурской популяции ризобий на образование клубеньков различных сортов сои (среднее за 4 года)

Сорта сои	Фаза			
	начало цветения		полное цветение	
	масса клубеньков, мг на раст., сух. в-ва	количество клубеньков на 1 раст.	масса клубеньков, мг на раст., сух. в-ва	количество клубеньков на 1 раст.
Октябрь 70	81 ± 15	33 ± 6	-	-
Хэйхэ 1	128 ± 32	51 ± 12	368	90
Кобра	77 ± 19	29 ± 10	362	88
Восход	100 ± 4	33 ± 6	-	-
Дочь Крапинки	93 ± 3	48 ± 9	-	-
Усреднённый показатель	96	39		

Развитие клубеньков в период начала цветения зависит в основном от темпов прироста надземной массы растений.

В период полного цветения указанные признаки в вариантах с контрастными показателями (сорта Хэйхэ 1 и Кобра) выравниваются. Это даёт основание считать, что в почвенной среде, где популяция ризобий сои представлена достаточно разнообразным штаммовым составом, партнёры симбиоза в основном комплементарны. Кроме того, в данном случае процесс образования клубеньков в наибольшей степени определяется гидротермическими и другими экологическими факторами. Следовательно, первичными в такой ситуации являются исходные возможности развития растения-хозяина.

В отличие от этого, при взаимодействии чистых культур ризобий со стерильными растениями в стерильной агаризованной среде, показатель вирулентности зависит от физиолого-биохимических взаимодействий (табл. 2).

При определении вирулентности двух аборигенных штаммов ризобий сои (медленнорастущий 648-а и быстрорастущий

БД-32) выявлены существенные различия данного признака. По отношению к 8 из 14 испытывавшихся сортов вирулентность штамма 648-а составила 93–100 %.

Таблица 2

Показатели вирулентности амурских штаммов ризобий по отношению к различным сортам сои, лабораторные опыты (среднее из 4-х опытов)

Название сорта	Происхождение сорта	Количество клубеньков на 1 растении		Вирулентность, %	
		в среднем	lim	штамм 648 а, медленно-растущий	штамм БД-32, быстрорастущий
Омская 4	г. Омск	5,7	3–9	100	54
Хабаровская 117	г. Хабаровск	4,0	1–8	100	40
Хабаровская 4	г. Хабаровск	7,1	2–11	100	67
Кобра	г. Хабаровск	3,5	2–5	82	47
Восход	г. Ершовск	2,2	0–4,5	100	0
Крепыш	респ. Крым	7,9	4,5–13	100	100
ВНИИС 1	Амурск. обл.	2,9	1–5	93	45
Рассвет	Амурск. обл.	4,6	1,5–8	100	70
Октябрь 70	Амурск. обл.	4,4	2–6	100	64
Дочь Крапинки	Амурск. обл.	4,5	2–6	93	83
Вега	Амурск. обл.	2,0	2–2	73	54
Хэйхэ 1	Китай	5,8	5–6	93	78
Хэйхэ 3	Китай	2,7	2,5–3	77	69
Соната	Амурск. обл.	6,9	3–11	93	68
Средний показатель	-	4,58	-	93,1	60,2

Этот же показатель у быстрорастущей формы в среднем оказался на 35 % ниже. Наиболее восприимчивым к обеим бактериальным формам является сорт Крепыш. По отношению к сортам Кобра, Вега, Хэйхэ 3 вирулентность первого штамма достигает 73–82 %. На этих же сортах минимальную вирулентность проявил и быстрорастущий штамм. Существенные колебания изучаемого показателя по отношению к некоторым сортам свидетельствуют о наличии определённых механизмов, препятствующих нодуляции. Возможно и проявление внутрисортной разнокачественности семян. Такая разнокачественность может отражаться на биохимических свойствах корневых выделений прорастающих семян.

В свою очередь, при реализации симбиотических взаимоотношений на корневую систему действует Nod-фактор, про-

дуцируемый ризобиями. Специфичность действия Nod-фактора определяется сигнальными молекулами, которые способствуют одновременно инфицированию корней и симбиоорганогенезу [11]. При первоначальном контакте сигнальных молекул и поверхности корней искривляются корневые волоски. Наблюдается подщелачивание цитоплазмы, колебания концентрации ионов К в клетках эпидермиса и деполяризация мембран.

По данным А. Хадри и Т. Бисселинга [12], Nod-фактор состоит из молекул хитиноподобного скелета, к которому присоединяется остаток жирной кислоты. Длина и степень ненасыщенности молекул жирной кислоты значительно варьирует. Это отражается на специфичности реакции симбионтов и, в конечном итоге, на уровне вирулентности.

Аналогичными причинами можно объяснить различия в показателях вирулентности медленно- и быстрорастущих штаммов. За время исследований было выделено 96 штаммов вида *B. japonicum* и 64 штамма вида *S. fredii*. Их вирулентность в среднем различалась более чем на 30 % (табл. 3).

Таблица 3

Вирулентность медленнорастущих и быстрорастущих штаммов ризобий сои, выделенных из почв Приамурья

Группы штаммов	Количество штаммов	Вирулентность	
		%	lim
Медленнорастущие <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	96	86,3	70–100
Быстрорастущие <i>Sinorhizobium fredii</i>	64	67,3	0–100

По данным Бегуна С.А. и др. [1], в лугово-черноземовидных почвах доля штаммов *B. japonicum* составила 72 % и доля штаммов *S. fredii* – 28 % от общего количества бактериальных форм указанных видов.

Можно полагать, что в такой же пропорции изучаемые штаммы (в зависимости от свойств) воздействуют на процессы симбиотической азотфиксации.

Как видно из таблицы 4, доля использования соей азота атмосферы у изучаемых сортов различается несущественно. По усреднённым данным при применении двух методов учёта сорт Гармония за два срока наблюдений использовал 77 % симбиотического азота, а сорт Нега – 74,5 %. Применявшиеся два метода определения доли фиксированного клубеньками атмосферного азота (метод сравнения с небобовой культурой и метод сравнения исходного сорта с его же формой-мутантом, образующим незначительное количество клубеньков низкой активности) продемонстрировали высокую сходимость результатов.

Таблица 4

Доля усвоения растениями сои атмосферного азота (%), определённого методами сравнения с небобовой культурой (овсом) и сортообразцом сои с неактивными клубеньками

Сорт, период вегетации	Фаза развития	Метод определения связанного азота в сравнении		Среднее по методам определения	Масса сухого вещества в конце цветения, г/раст.
		с овсом	с соей с неактивными клубеньками		
Гармония, 100–108 дней	Цветение	78,0	77,0	77,5 ± 0,5	12,7
	Созревание	76,0	73,0	74,5 ± 1,5	
	Среднее за две фазы	77,0	75,0	76,0 ± 1,0	
Нега 1, 110–116 дней	Цветение	82,0	82,0	82,0 ± 0	13,9
	Созревание	67,0	63,0	65,0 ± 2,0	
	Среднее за две фазы	74,5	72,5	73,5 ± 1,0	
НСР ₀₅					2,0

Можно отметить, что по масштабам использования фиксированного азота, некоторое преимущество имеет сорт Гармония. Особенности данного процесса достаточно заметно выявляются по фазам развития. Следовательно, сортовая спе-

цифика усвоения симбиотического азота зависит в основном от темпов развития растений по фазам вегетации и от продолжительности вегетационного периода.

Выводы. 1. Клубеньковые бактерии сои, обитающие в лугово-черноземовидных почвах Приамурья, способствуют массовому образованию клубеньков и характеризуются высоким уровнем вирулентности ко всем испытывавшимся сортам. Вне зависимости от географического происхождения на корнях сои в изучаемых условиях в середине вегетационного периода образуется от 29 до 90 клубеньков в расчёте на 1 растение.

2. Вирулентность аборигенных штаммов ризобий сои в различных факториальных сочетаниях составляет от 45 до 100 %. По отношению к сортам сои различного географического происхождения чётких различий по вирулентности не выявлено. Минимальные значения данного показателя установлены для сортов Восход, ВНИИС 1, Кобра.

3. Штаммы быстрорастущего вида ризобий сои *S. fredii* обладают меньшей вирулентностью по сравнению со штаммами вида *V. japonicum*. Данный показатель составляет соответственно 40–100 и 73–100 % применительно к изучавшимся сортам.

4. Доля использования симбиотического азота амурскими сортами Гармония и Нега 1 по усреднённым данным составляет 72,5–77,0 %. Сортные различия выявляются в зависимости от фазы вегетации и продолжительности вегетирования.

5. Определение доли использования соей симбиотического азота методом сравнения с небобовой культурой (овсом) и методом сравнения исходного сорта с его же формой-мутантом, образующим незначительное количество клубеньков низкой активности, продемонстрировали высокую сходимость результатов в обе изучаемые фазы развития растений: соот-

ветственно 78–77 %...76–73 % и 82–82 %...67–63 %.

Список литературы

1. Бегун С.А., Тильба В.А., Якименко М.В. Распространение медленно- и быстрорастущих штаммов клубеньковых бактерий сои в почвах Приамурья // В сб.: Селекция и технология производства сои. ВНИИСои. – Благовещенск, 1977. – С. 33–38.
2. Бегун С.А. Влияние клубеньковых бактерий на продуктивность сои в районах давнего соеосеяния: дис. ... канд. биол. наук. – Благовещенск, 1982. – 180 с.
3. Бегун С.А., Тильба В.А. Скудно растущая форма сои с неэффективным симбиотическим аппаратом // Науч.-тех. бюл. ВИР. – 1992. – Вып. 220. – С. 71–74.
4. Грицун А.Т. Роль бобовых культур (соя, клевер) в накоплении биологического азота и повышении плодородия почв в условиях Дальнего Востока // Агрехимия. – 1975. – № 5. – С. 17–24.
5. Доросинский Л.М., Тильба В.А., Бегун С.А. Влияние бактеризации на урожай сои и фиксацию молекулярного азота в почвах Дальнего Востока. // Соя и нитрагин. Науч.-тех. бюл. – 1976. – № 1. – С. 18–22.
6. Мишустин Е.Н., Шильникова В.К. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. – М.: Наука, 1973. – 288 с.
7. Трещачёв Е.П., Атрашкова Н.А., Хабаровова А.И. О методах определения и размерах фиксации атмосферного азота бобовыми растениями // В сб.: Биологический азот в земледелии нечернозёмной зоны СССР. – М.: Колос, 1970. – С. 27–74.
8. Тильба В.А. К вопросу определения численности клубеньковых бактерий сои в почве // Микробиологические и биохимические методы исследования почв. – Киев, 1971. – С. 51–55.
9. Тильба В.А., Бегун С.А. Об использовании биологического азота амурскими сортами сои // Биология, генетика и мик-

робиология сои. – Новосибирск, 1976. – С. 74–79.

10. Тильба В.А., Бегун С.А., Садовская Е.В. Определение эффективности штаммов *Rhizobium japonicum* на первичном этапе отбора // Резервы повышения эффективности соеводства: сб. науч. тр. Сиб. Отд. ВАСХНИЛ ВНИИ сои. – Новосибирск, 1988. – С. 79–89.

11. Хадри А.Е., Спайк Г., Бисселинг Т., Бревин Н. Разнообразие процессов образования корневых клубеньков и их инфицирования ризобиями // В сб.: Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Ред. Г. Спайк, А. Кондорози, П. Хукас. Русский перевод под ред. И.А. Тихоновича и Н.А. Проворова. – СПб., 2002. – С. 373–415.

12. Хадри А.Е. Бисселинг Т. Реакция растений на Nod-факторы // Сб. Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий взаимодействующих с растениями. Ред. Г. Спайк, А. Кондорози, П. Хукас. Русский перевод под ред. И.А. Тихоновича и Н.А. Проворова. – СПб., 2002. – С. 435–450.

References

1. Begun S.A., Til'ba V.A., Yakimenko M.V. Rasprostranenie medlenno- i bystrorastushchikh shtammov kluben'kovykh bakteriy soi v pochvakh Priamur'ya // V sb.: Seleksiya i tekhnologiya proizvodstva soi. VNIIsai. – Blagoveshchensk, 1977. – S. 33–38.

2. Begun S.A. Vliyanie kluben'kovykh bakteriy na produktivnost' soi v rayonakh davnego soseyaniya: dis. ... kand. biol. nauk. – Blagoveshchensk, 1982. – 180 s.

3. Begun S.A., Til'ba V.A. Skudno rastushchaya forma soi s neeffektivnym simbioticheskim apparatom // Nauch.-tekhn. byul. VIR. – 1992. – Вып. 220. – С. 71–74.

4. Gritsun A.T. Rol' bobovykh kul'tur (soi, klever) v nakoplenii biologicheskogo azota i povyshenii plodorodiya pochv v usloviyakh Dal'nego Vostoka // Agrokhimiya. – 1975. – № 5. – С. 17–24.

5. Dorosinskiy L.M., Til'ba V.A., Begun S.A. Vliyanie bakterizatsii na urozhay soi i fiksatsiyu molekulyarnogo azota v pochvakh Dal'nego Vostoka. // Soya i nitragin. Nauch.-tekhn. byul. – 1976. – № 1. – С. 18–22.

6. Mishustin E.N., Shil'nikova V.K. Kluben'kovye bakterii i inokulyatsionnyy protsess. – М.: Nauka, 1973. – 288 s.

7. Trepachev E.P., Atrashkova N.A., Khabarova A.I. O metodakh opredeleniya i razmerakh fiksatsii atmosfernogo azota bobovymi rasteniyami // V sb.: Biologicheskii azot v zemledelii nechernozemnoy zony SSSR. – М.: Kolos, 1970. – С. 27–74.

8. Til'ba V.A. K voprosu opredeleniya chislennosti kluben'kovykh bakteriy soi v pochve // Mikrobiologicheskie i biokhimicheskie metody issledovaniya pochv. – Kiev, 1971. – С. 51–55.

9. Til'ba V.A., Begun S.A. Ob ispol'zovanii biologicheskogo azota amurskimi sortami soi // Biologiya, genetika i mikrobiologiya soi. – Novosibirsk, 1976. – С. 74–79.

10. Til'ba V.A., Begun S.A., Sadovskaya E.V. Opredelenie effektivnosti shtammov *Rhizobium japonicum* na pervichnom etape otbora // Rezervy povysheniya effektivnosti soevodstva: sb. nauch. tr. Sib. Otd. VASKhNIL VNIИ soi. – Novosibirsk, 1988. – С. 79–89.

11. Khardi A.E., Spaynk G., Bisseling T., Brevin N. Raznoobrazie protsessov obrazovaniya kornevykh kluben'kov i ikh infitsirovaniya rizoibiyami // V sb.: Rhizobiaceae. Molekulyarnaya biologiya bakteriy, vzaimodeystvuyushchikh s rasteniyami / Red. G. Spayk, A. Kondoroshi, P. Khuras. Russkiy perevod pod red. I.A. Tikhonovicha i N.A. Provorova. – SPb., 2002. – С. 373–415.

12. Khardi A.E. Bisseling T. Reaktsiya rasteniy na Nod-factory // Sb. Rhizobiaceae. Molekulyarnaya biologiya bakteriy vzaimodeystvuyushchikh s rasteniyami / Red. G. Spayk, A. Kondoroshi, P. Khuras. Russkiy perevod pod red. I.A. Tikhonovicha i N.A. Provorova. – SPb., 2002. – С. 435–450.