

Оценка новых штаммов эндофитных бацилл и ризобий при инокуляции фасоли сорта Уфимская в условиях Предуралья

С. Р. Гарипова^{1*}, Р. Ш. Иргалина², Д. Ф. Дмитриева¹,
А. Г. Кутуева¹

¹ Башкирский государственный университет
Россия, г. Уфа, 450076, улица Заки Валиди, 32.

² Башкирский государственный аграрный университет
Россия, г. Уфа, 450001, улица 50-летия Октября, 34.

*Email: garisveta@rambler.ru

Новые штаммы *Bacillus subtilis* SG12 и *Rhizobium leguminosarum* SG13 сравнивали с соответствующими стандартными штаммами 26Д и 2630 в автономных и комбинированных обработках семян фасоли. Наибольшую семенную продуктивность 8.5 г/растение дала обработка SG12+SG13, на 67% превысившая контроль без бактерий и на 27% – комбинацию стандартных штаммов. Бактериальные препараты способствовали увеличению длины и ветвистости корневой системы, снижению развития болезней. Лучший урожай обеспечил штамм SG13, увеличивший на 36% выход семян с квадратного метра по сравнению с контролем.

Ключевые слова: эндофиты, бациллы, ризобии, фасоль, устойчивость, продуктивность.

Экологически чистым способом повышения продуктивности и устойчивости сельскохозяйственных растений является применение микробных препаратов [1; 2], улучшающих азотное [3] и фосфорное [4] питание растений, обеспечивающих защиту от фитопатогенов [5], стимулирующих рост растений [6], утилизирующих остаточные количества ксенобиотиков [7]. Среди разнообразных бактерий, входящих в фитобиом бобового растения, особый интерес представляют эндофитные бациллы и ризобии, способные повышать продуктивность растений [8]. Бациллы широко известны как агенты биоконтроля бактериальных и грибных фитопатогенов [9], ризобии – как активные азотфиксаторы и продуценты фитогормонов [10]. Кроме того, клубеньковые бактерии способны проявлять антагонизм к грибным фитопатогенам [11–13] и повышать устойчивость бобовых растений к вирусным поражениям макросимбионта [14]. Путем селекции активных по азотфиксации и комплексу других свойств штаммов клубеньковых бактерий достижимо увеличение продуктивности гороха на 60% [15]. Отмечается, что весьма эффективным средством подавления возбудителей грибных болезней может быть совместное действие ризобий и бацилл [16, 17]. Но при разработке комбинированных композитов бактерий важно учитывать биотические взаимоотношения взаимодействующих штаммов. Поэтому представляется перспективным проводить поиск

бактерий среди эндофитов, которые прошли природный отбор на совместимость [18]. Ранее были изучены выделенные из клубеньков гороха и фасоли бактериальные ассоциации [19] и отдельные штаммы эндофитных бактерий [20, 21]. Определена комплексная биологическая активность этих штаммов *in vitro* [22], их способность увеличивать длину и площадь поверхности корня и побега, энергию прорастания семян. Для дальнейших исследований из рабочей коллекции были выбраны штаммы *Bacillus subtilis* 522 и *Rhizobium leguminosarum* 630, названные соответственно SG12 и SG13, которые испытывали в полевых условиях.

Целью данного исследования являлась оценка влияния комбинированных и автономных обработок фасоли новыми и известными штаммами эндофитных бацилл и ризобий на продуктивность и устойчивость растений в условиях Предуралья.

Объектами исследования служили: эталонный штамм *Bacillus subtilis* 26D (бактериальная основа препарата фитоспорин), полученный из коллекции лаборатории биотехнологии БашГАУ, штамм *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* 2630, полученный из коллекции ВНИИСХМ, а также новые штаммы *Bacillus subtilis* SG12 и *Rhizobium leguminosarum* SG13, выделенные из клубеньков фасоли, депонированные в ВКПМ под номерами В-11726 и В-11760. Семена растений фасоли сорта Уфимская были получены у оригинатора Самигуллина С. Н. и воспроизведены в собственной многолетней репродукции. Полевые мелкоделяночные опыты проводили в 2015 г. на поле Учебно-научного центра БГАУ. Почва чернозем выщелоченный. Семена фасоли перед посевом обрабатывали водными суспензиями бактерий: бациллы в плотности 10^5 клеток на семя, ризобий – 10^7 клеток на семя, в комбинированном препарате: бациллы 10^5 , ризобии 10^6 клеток на семя. Посев проводили вручную широкорядным способом (45 см) с нормой высева 15 семян на погонный метр (333 шт. / га) 25 мая, уборку – 14 сентября. Признаки фитопатологии надземной части растений отмечали в стадии цветения, корневые гнили и характеристики развития корней – в стадии созревания растений. Учетная площадь каждой из делянок, заложенных рендомизированно в трех повторностях, $1,35 \text{ м}^2$. Анализировали индивидуально каждое растение. Агроклиматические факторы в первой половине вегетации до цветения растений (середина июля) были экстремально засушливыми. Затем наблюдалась прохладная и дождливая погода. В августе и сентябре минимальная температура не опускалась ниже $10 \text{ }^\circ\text{C}$, что способствовало полному созреванию плодов и семян фасоли.

В результате проведенных полевых исследований было установлено (табл. 1), что контрольные растения фасоли сорта Уфимская в 2015 г. имели признаки хлорозной мраморности (42% площади листьев) и пузырчато-морщинистых повреждений (9% листовой поверхности). Предполагается, что эти признаки являлись следствием вирусных поражений. Развитие корневых гнилей у необработанных бактериями растений составило 27%.

Таблица 1. Влияние бактериальных обработок на устойчивость растений к болезням листьев и корней

Вариант обработки	Признаки и степень поражения листьев и корней, %			Длина органов, см		Степень разветвленности, баллы	
	Пузырчатоморщинистые тип листа	Хлорозная мраморность листа	Корневые гнили	корня	побега	корня	побега
Без бактерий	8.9±3.0	42.1±5.7	26.9±1.6	6.8±0.4	33.2±1.4	1.4±0.1	1.4±1.1
SG12	3.5±1.3	26.0±5.2	18.1±1.8	8.1±0.4	26.0±1.0	2.0±0.1	1.3±0.1
SG13	2.1±0.9	13.9±2.6	22.4±2.1	9.2±0.6	32.3±1.1	1.7±0.1	1.8±0.1
26D	6.3±1.9	36.3±6.5	19.4±1.6	9.0±0.6	31.5±1.0	1.9±0.1	1.8±0.1
2630	1.3±0.7	22.0±4.9	17.3±1.6	10.3±0.7	28.2±1.1	1.9±0.1	1.7±1.1
SG12+SG13	4.4±1.6	35.6±5.3	22.8±2.8	7.6±0.6	32.2±1.5	2.0±0.1	2.2±0.2
26D+2630	9.2±3.0	21.7±4.5	23.8±2.2	8.3±0.6	30.9±1.0	2.0±0.1	2.0±0.1

Применение бактериальных обработок новыми и эталонными штаммами существенно снизило проявление болезней листьев. Особенно эффективным было уменьшение в 3–4 раза пузырчатых деформаций при действии штаммов SG12, SG13 в автономных и комбинированных обработках. Хлорозы были минимальны в варианте обработки штаммом SG13. Корневые гнили в меньшей степени развивались при инокуляции штаммами бацилл SG12 и 26D и ризобияльными штаммом 2630. Все бактериальные обработки способствовали улучшению архитектуры корневой системы: длины и степени ветвистости боковых и придаточных корней. Но высота растений была меньше у растений, обработанных штаммами SG12 и 2630. У последнего она компенсировалась улучшением архитектуры растений, чего не наблюдалось в варианте обработки SG12.

Анализ продуктивности растений фасоли при обработке разными штаммами бактерий показал (табл. 2), что по сравнению с контролем без инокуляции значимое увеличение массы растений (на 42%), количества бобов (на 34%) и семян (на 40%), а также массы семян с одного растения (на 67%) отмечено в варианте комбинированной обработки новыми штаммами SG12+SG13. В варианте автономной обработки штаммом SG12 произошло снижение указанных показателей продуктивности растений. По урожаю семян с квадратного метра с учетом плотности и сохранности растений наиболее высокие показатели обеспечила обработка штаммом SG13 – прибавка составила 36%. Стандартные штаммы 26D и 2630 оказали положительное, но статистически недостоверное улучшение анализируемых показателей растений.

Таблица 2. Характеристики продуктивности растений фасоли

Вариант обработки	Масса растения, г	Количество бобов, штук на растение	Количество семян, штук на растение	Масса семян, г на растение	Урожай, г/м ²
Без бактерий	9.8±0.8	4.4±0.4	14.4±2.5	5.1±0.5	133±16
SG12	6.4±0.8	3.4±0.3	10.9±1.1	4.3±0.5	114±13
SG13	11.4±1.5	4.8±0.6	15.8±2.1	6.6±0.8	181±19
26D	10.4±1.0	4.7±0.4	15.1±1.3	6.0±0.5	160±13
2630	9.6±1.1	4.4±0.4	13.9±1.4	5.7±0.6	139±15
SG12+SG13	13.9±1.8	5.9±0.7	20.2±2.7	8.5±1.1	163±14
26D+2630	11.3±1.6	4.9±0.5	15.1±1.8	6.7±0.9	164±17

Таким образом, совместное действие новых штаммов SG12+SG13, а также автономная обработка штаммом SG13 рекомендуются для экологически чистого способа повышения продуктивности и устойчивости к болезням фасоли сорта Уфимская за счет активизации полезных симбиотических связей с растениями.

Литература

1. Тихонович И. А., Проворов Н. А. Сельскохозяйственная биология как основа экологически устойчивого агропроизводства: Фундаментальные и прикладные аспекты // Сельскохозяйственная биология. 2011. №3. С. 3–9.
2. Чеботарь В. К., Мальфанова Н. В., Щербаков А. В., Ахтемова Г. А., Борисов А. Ю., Люгтенберг Б., Тихонович И. А. Эндофитные бактерии в микробных препаратах, улучшающих развитие растений (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. №3. С. 283–289.
3. Умаров М. М. Азотфиксация в ассоциациях микроорганизмов // Проблемы агрохимии и экологии. 2009. №2. С. 22–26.
4. Кузьмина Л. Ю., Высоцкая Л. Б., Галимзянова Н. Ф., Гильванова Е. А., Рябова А. С., Мелентьев А. И. Новые штаммы фосфатмобилизирующих бактерий, продуцирующих ауксин, перспективные для сельскохозяйственной биологии // Известия УНЦ РАН. 2015. №1. С. 40–46.
5. Максимов И. В., Абизгильдина Р. Р., Пусенкова Л. А. Стимулирующие рост растений микроорганизмы как альтернатива химическим средствам защиты от патогенов // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. №4. С. 1–14.
6. Иванчина Н. В., Гарипова С. Р. Влияние ростстимулирующих бактерий (PGPB) на продуктивность и устойчивость растений // Агрохимия. 2012. №7. С. 87–95.

7. Garipova S. R. Perspectives on using endophytic bacteria for the bioremediation of arable soils polluted by residual amounts of pesticides and xenobiotics // *Biology Bulletin Reviews*. 2014. Vol. 4. No 4. Pp. 300–310.
8. Гарипова С. Р. Экологическая роль эндофитных бактерий в симбиозе с бобовыми растениями и их применение в растениеводстве // *Успехи современной биологии*. 2012. Т. 132. №5. С. 493–505.
9. Мелентьев А. И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus Cohn* в агроэкосистемах. М., 2007. 148 с.
10. Волобуева О. Г. Симбиотическая азотфиксация как фактор экологической безопасности и плодородия почвы // *Вестник РУДН. Серия Экология и безопасность жизнедеятельности*. 2011. №1. С. 53–60.
11. Кашаева С. Р., Мелентьев А. И., Кузьмина Л. Ю. Влияние инокуляции гороха клубеньковыми и ризосферными бактериями на азотфиксирующую активность и устойчивость к корневым гнилям // *Защита растений в условиях реформирования агропромышленного комплекса: Экономика, эффективность, экологичность: Тез. докл. Всеросс. Съезда по защите растений, С.-Пб., декабрь, 1995. СПб., 1995. С. 320–321.*
12. Гарипова С. Р., Мелентьев А. И., Кузьмина Л. Ю., Гильванова Е. А. Инокуляция гороха клубеньковыми бактериями в сочетании с бактериальным препаратом Бациспецин // *Энергоресурсосбережение в Республике Башкортостан: Материалы Второй научно-практической конференции. Ч. 2. Уфа: Изд-во УГАТУ, 1999. С. 272–278.*
13. Hemissi I., Mabrouk Y., Abdi N. Bouraoui M., Saidi M., Sifi B. Effects of some *Rhizobium* strains on chickpea growth and biological control of *Rhizoctonia solani* // *African J. Microbiol. Res.* 2011. Vol. 24. No 5. Pp. 4080–4090.
14. Пирог А. В. Действие биопрепаратов на урожайность и качество продукции люпина желтого при вирусном инфицировании // *Вестник Алтайского ГАУ*. 2013. Т. 109. №11. С. 018–022.
15. Кашаева С. Р. Селекция высокоэффективных штаммов клубеньковых бактерий для инокуляции гороха в условиях Южного Урала. Автореферат дис. ...канд. биол. наук. СПб, 1994. 24 с.
16. Иванчина Н. В., Гарипова С. Р., Шавалеева Д. В., Уразбахтина Н. А., Захарова Р. Ш., Хайруллин Р. М. Влияние штаммов *Bacillus subtilis* на продуктивность растений гороха при автономной и совместной инокуляции со штаммом *Rhizobium leguminosarum bv viceae 1078* // *Агрохимия*. 2008. №10. С. 34–39.
17. Akhtar M. S., Shakeel U., Siddiqui Z. A. Biocontrol of *Fusarium* wilt by *Bacillus pumilis*, *Pseudomonas alcaligenes* and *Rhizobium* sp. on lentil // *Turk J. Biol.* 2010. Vol. 34. Pp. 1–7.
18. Гарипова С. Р. Развитие методологических подходов к разработке микробных препаратов для повышения продуктивности и устойчивости сельскохозяйственных растений // *Вестник Оренбургского университета*. 2009. № S10. С. 437–439.

19. Гарипова С. Р., Гарифуллина Д. В., Маркова О. В., Иванчина Н. В., Хайруллин Р. М. Изучение бактериальных ассоциаций эндофитов клубеньков растений гороха и фасоли, способствующих увеличению продуктивности бобовых растений // *Агрехимия*. 2010. №11. 50–58.
20. Маркова О. В., Гарипова С. Р., Яхина Л. Р., Максютлова А. А. Влияние инокуляции семян отдельными штаммами ассоциации Ф5 на продукционный процесс и устойчивость растений фасоли // *Настоящее и будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского, лесного хозяйства и промышленности: Сб. науч. тр. Научно-практического семинара с международным участием, Ульяновск, 2011. С. 67–71.*
21. Маркова О. В., Гарипова С. Р. Взаимодействие ассоциации эндофитных бактерий Ф4 с растениями *Phaseolus vulgaris* L. в зависимости от метеорологических факторов // *Биология – наука XXI века: Материалы Международной конференции*. Москва, 24 мая 2012 г. / Ред. Р. Г. Васильев. – М.: МАКС Пресс, 2012. С. 542–543.
22. Гарипова С. Р., Гарифуллина Д. В., Маркова О. В., Уразбахтина Н. А., Хайруллин Р. М. Комплексная биологическая активность эндофитных бактерий // *Известия УНЦ РАН*. 2015. №4/1. С. 25–28.

Статья рекомендована к печати кафедрой экологии и ботаники БашГУ
(докт. биол. наук, проф. Е. И. Новоселова)

Evaluation of new strains of endophytic bacilli and rhizobia when inoculated of common bean *Ufimskaya* variety under South Ural

S. R. Garipova^{1*}, R. Sh. Irgalina², D. F. Dmitrieva¹, A. G. Kutueva¹

¹ *Bashkir State University*

32 Zaki Validi Street, 450076 Ufa, Russia.

² *Bashkir State Agrarian University*

34 50-let Oktyabrya Street, 450001 Ufa, Russia.

*Email: garisveta@rambler.ru

New strains of *Bacillus subtilis* SG12 and *Rhizobium leguminosarum* SG13 were compared with the corresponding standard strains 26D and 2630 in autonomic and combined treatments of common bean seeds. The most productivity of 8.5 g per plant gave the treatment by SG12 + SG13 strains, that was 67% higher than control without bacteria and 27% higher than the combination of standard strains. Bacteria contributed to an increase of the root system length and branching, to the reducing of disease development. The best crop was provided by SG13 strain, that supplied the 36% increase of seed yield per square meter, compared with the control.

Keywords: endophytes, bacillus, rhizobia, common bean, resistance, productivity.