

Новые эффективные штаммы клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium japonicum* и *Mesorhizobium ciceri*

И. О. Власова*, В. И. Кузнецов

Научно-Внедренческое Предприятие «БаиИнком»

Россия, Республика Башкортостан, 450015 г. Уфа, улица Карла Маркса, 37к1.

*Email: irochkarutt@mail.ru

Выделены новые штаммы клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium japonicum* и *Mesorhizobium ciceri*; определена эффективность инокуляции семян растений данными штаммами.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, *Bradyrhizobium japonicum*, *Mesorhizobium ciceri*, соя, нут.

В последние годы наметился повышенный спрос на бобовые культуры в России. Так, в 2017 году размер площадей под сою вырос по отношению к 2016 году на 16.9% и достиг рекордных отметок в 2 604.3 тыс. га. Многолетний накопленный научный и практический задел свидетельствуют о возможности эффективного возделывания этой ценной культуры в широком ареале.

Еще одной ценной бобовой культурой является нут. В России посевы нута встречаются на Северном Кавказе, в Ставропольском и Краснодарском краях, на юго-востоке страны и в Западной Сибири. Посевная площадь его составляет около 20 тыс. га.

Важную роль в формировании высоких урожаев бобовых культур играют специфические клубеньковые бактерии, вступающие в симбиоз с растением. В современных технологиях выращивания бобовых широко используются биопрепараты на основе высокоэффективных штаммов специфических ризобий, что позволяет получать высокие стабильные урожаи на биологическом азоте, т.к. он наиболее полно усваивается растениями [1].

Целью работы является выделение эндофитных бактерий из клубеньков растений бобовых культур, получение чистых культур штаммов, их идентификация и изучение свойств. Объектом исследования являлись штаммы бактерий – *Bradyrhizobium japonicum* – вид клубеньковых бактерий, сапрофитный азотфиксирующий симбионт сои (*Glycine max*), а также штаммы бактерий – *Mesorhizobium ciceri* – вид клубеньковых бактерий, азотфиксирующий симбионт нута (*Cicer arietinum*).

Штаммы были выделены из клубеньков сои и нута, возделываемой в Уфе на опытных полях. Выделение аборигенных клубеньковых бактерий проводили по стандартной

методике [2] в модификации В. А. Тильбы и С. А. Бегуна [3]. Для этого были отобраны хорошо развитые растения в фазе цветения – плодообразования и с их корнями отбирали крупные клубеньки.

При идентификации клубеньковых бактерий на основе культурально-морфологических методов нами выявлено 7 штаммов *Bradyrhizobium japonicum* и 5 штаммов *Mesorhizobium ciceri*. Идентификация по морфологическим признакам проводилась по определителю Берджи. Для выделения штаммов бактерий поверхностно стерильные клубеньки разрушали пинцетом, и выделяли срединную часть клубенька, которую использовали для посева на поверхность твердой питательной среды, с последующим выделением колоний

Определение вирулентности штаммов проводили по методике З. Г. Разумовской.

Для этого приготовили питательную среду следующего состава: K_2HPO_4 , $MgSO_4$, $CaCO_3$, $FeSO_4$, HNO_3 , $MnSO_4$, агар, разливали в большие биологические пробирки высотой среды 4 см, закрыв ватно-марлевыми пробками, стерилизовали при 121°C в течение 20 мин. Одновременно стерилизовали семена сои. Сначала семена обрабатывали спиртом (для лучшей их смачиваемости), затем промывали стерильной водой и помещали в стерильные колбы с 0.1%-ным раствором сулемы и выдерживали семена в течение 10 мин.

По истечении времени обработки семена 4-хкратно промывали стерильной водой. Затем семена переносили в среду с МПА на сутки для исключения контаминации. Отобранные простерилизованные семена помещали в чашки Петри с фильтровальной бумагой с тонким слоем стерильной воды на 3 суток. К тому времени семена прорастали (длина проростков – 3–5 мм). После прорастания семена стерильным пинцетом переносили в условия *in vitro* с агаровой средой, инокулировали 1 мл суспензией культуры (24 штаммов) клубеньковых бактерий титром 10^7 , каждый вариант – в 3-х повторностях. Пробирки снаружи обертывали черной пленкой на высоту 5 см, для создания корням затемненных условий. Растения *in vitro* выращивали в условиях искусственного освещения 10 часового светового дня, при 23°C, влажности – 70%, на фитотроне.

Контроль – без инокуляции. При изучении процесса инфицирования в течение 15 дней ежедневно проводились наблюдения за корневой системой инокулированных растений сои. Корни просматривали под световым микроскопом по всей длине участками по 3 мм, подсчитывали на каждом участке общее количество корневых волосков, число искривленных как ручка зонтика, число специфически искривленных.

Определено, что среди выделенных штаммов вирулентными оказались 5 штаммов *Bradyrhizobium japonicum* и 4 штамма *Mesorhizobium ciceri*.

Эффективность данных штаммов по способности образовывать на растениях бобовых культур активные клубеньки учитывалась по наличию леггемоглобина в центральной части клубенька.

Для этого семена растений бобовых культур (предварительно стерилизованных) заражали штаммами выделенных клубеньковых бактерий и выращивали на светоплощадке до стадии бутонизации. Далее растение извлекали из горшка, отмывали корень от субстрата и проводили визуальный анализ образовавшихся клубеньков.

Измерена нитрогеназная активность каждого штамма методом газовой хроматографии. Отобраны штаммы с наибольшими показателями нитрогеназной активности: *Bradyrhizobium japonicum* штамм №3 и *Mesorhizobium ciceri* штамм №2.

Таблица 1

Штаммы	Контроль	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>					<i>Mesorhizobium ciceri</i>			
		1	2	3	4	5	1	3	2	4
Нитрогеназная активность (мкг/мл/ч)	0.06	0.16	0.205	0.514	0.128	0.242	0.152	0.374	0.133	0.06

Выводы

Таким образом, на основании полученных данных вирулентности, нитрогеназной активности штаммов и их способности образовывать активные клубеньки на корнях растений нами были отобраны наиболее эффективные штаммы *Bradyrhizobium japonicum* и *Mesorhizobium ciceri*.

Культивирование селективированных штаммов проводили в 2 этапа. Первый – подращивание в колбах на перемещающемся устройстве. Второй – культивирование в био-реакторе.

Подобраны методы промышленного культивирования селективированных штаммов ризобий. Нарботана культуральная жидкость перспективных штаммов ризобий и доказана их эффективность в лабораторных и полевых опытах на инокуляции бобовых культур.

Таким образом, изучены культурально-морфологические свойства селективированных штаммов. Штаммы готовятся к депонированию.

Литература

1. Завалин А. А. Биопрепараты, удобрения и урожай. Текст / А. А. Завалин. Москва: ВНИИА, 2005. – 302с.
2. Лунин, Н. Д. Методика выделения эффективных штаммов клубеньковых бактерий сои Текст. / Н. Д. Лунин // Селекция и семеноводство. 1977. – №4. – С. 74–75.
3. Бегун, С. А., Тильба В. А. Способы, приемы изучения и отбора эффективных штаммов клубеньковых бактерий сои. Методы аналитической селекции Текст. / С. А. Бегун, В. А. Тильба. Благовещенск: Изд-во «Зея», 2005. – 70 с.
4. Тильба, В. А. Влияние молибдена на титр клубеньковых бактерий сои Текст. / В. А. Тильба, С. А. Бегун // Бюл. ВНИИ сои. Новосибирск, 1981. – Вып. 30. – С. 73–77.

New effective strains of nodule bacteria *Bradyrhizobium japonicum* and *Mesorhizobium ciceri*

I. O. Vlasova*, V. I. Kuznetsov

SIP «Bashinkom»

37/1 Karl Marx Street, 450015 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

**Email: irochkarutt@mail.ru*

New strains of nodule bacteria *Bradyrhizobium japonicum* and *Mesorhizobium ciceri* were isolated; the effectiveness of inoculation of plant seeds with these strains was determined.

Keywords: nodule bacteria, *Bradyrhizobium japonicum*, *Mesorhizobium ciceri*, soybean, chickpea.