

УДК 579.841.31:633.853.52

СВОЙСТВА КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

С.А. Бегун, М.В. Якименко, ВНИИ сои

В почвах Дальнего Востока обитает достаточно многообразная по свойствам природная популяция клубеньковых бактерий сои. Впервые, в чистую культуру штаммы ризобий сои были выделены в 1975 году. Начиная с этого времени, во ВНИИ сои отработывались и осваивались различные методы селекционной работы по оценке и отбору перспективных штаммов ризобий сои.

К настоящему периоду в рабочей коллекции ВНИИ сои насчитывается около 200 штаммов ризобий сои двух видов, выделенных из природной популяции в разные годы. Виды ризобий сои *B. japonicum* и *S. fredii* в коллекции лаборатории представлены практически равным количеством штаммов.

Коллекционные штаммы ризобий сои *B. japonicum* и *S. fredii*, в процессе жизнедеятельности и усвоения углеводов, выделяют продукты метаболизма различного характера. Так, штаммы медленнорастущего вида *B. japonicum* при росте на среде МРС с маннитом на 15 сутки чаще всего (более 80%) выделяют продукты щелочного или нейтрального характера. Тогда как среди коллекционных штаммов *S. fredii* щелочеобразующие формы ризобий на 15 сутки роста не выявляют (табл. 1, 2).

Таблица 1

Характеристика коллекционных штаммов ризобий сои по показателям выделения продуктов метаболизма в процессе хранения в холодильнике

Виды ризобий	Сроки наблюдений, сутки	Единицы измерения	Продукты метаболизма		
			нейтральные	кислые	щелочные
<i>B. japonicum</i>	15	шт.	26	15	51
		%	28	17	55
	180	шт.	23	8	61
		%	25	9	66
<i>S. fredii</i>	15	шт.	31	48	0
		%	39	61	0
	180	шт.	19	41	19
		%	24	52	24

Через 180 суток среди чистых культур *S. fredii* начинают выявляться штаммы, выделяющие продукты метаболизма щелочного характера. Однако штаммы *S. fredii* с устойчивыми показателями щелочеобразования не выявлены.

Таблица 2

Изменение метаболизма у штаммов ризобий сои в процессе их хранения в холодильнике в течение 180 суток

Показатели		<i>B. japonicum</i>		<i>S. fredii</i>	
		количество	в % к общему	количество	в % к общему
Проанализировано штаммов, в том числе		92	100	79	100
Со стабильной характеристикой продуктов метаболизма	нейтральные	0	0	6	8
	кислые	7	8	21	26
	щелочные	43	47	0	0
С изменяющейся характеристикой продуктов метаболизма	нейтрально-щелочные	39	42	23	29
	нейтрально-кислые	3	3	29	37

С целью изучения видового разнообразия и перекрестного заражения ризобиями некоторых зернобобовых культур проводили специальные лабораторные опыты со штаммами видов *B. japonicum* (648 а), *S. fredii* (ТБ-427), *R. leguminosarum* bv. *viciae* (260 б), bv. *phaseoli* (700). Установлено, что на корнях сои могут образовываться клубеньки за счет инфицирования штаммами гороха и фасоли (табл. 3).

Таблица 3

Возможность нодулирования некоторых бобовых культур штаммами ризобий сои, гороха и фасоли

Бобовая культура	<i>B. japonicum</i>		<i>S. fredii</i>		<i>R. leguminosarum</i>		<i>R. phaseoli</i>	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Соя	5,2	93	1,9	71	0,7	28	0,4	20
Горох	0	0	0	0	5,7	33	0	0
Фасоль красная	2,3	28	0	0	11,0	78	40,6	100
Фасоль белая	0	0	2,1	23	15,3	100	69,0	100
Маш	9,3	67	0	0	0	0	0	0

В то же время, соевые штаммы ризобий вызывают клубенькообразование у некоторых видов фасоли. Штамм ризобий сои 648 а интенсивно образует клубеньки на корнях новой зернобобовой культуры - фасоли золотой (маша).

В серии лабораторных экспериментов изучали осмоустойчивость штаммов быстрорастущего (*S. fredii*) и медленно растущего (*B. japonicum*) видов. Оказалось, что коллекционные штаммы медленно растущего вида *B. japonicum* обладают слабой осмоустойчивостью и уже при концентрации поваренной соли 0,4 М практически приостанавливают рост, тогда как бактерии быстрорастущего вида *S. fredii* обладают высокой солеустойчивостью, до 75% штаммов этого вида хорошо растут на средах с повышенной концентрацией поваренной соли. (Табл. 4).

Таблица 4

Осмотическая устойчивость штаммов ризобий сои двух видов

Штаммы <i>B. japonicum</i>	Интенсивность роста штриха при конц. NaCl, М			Штаммы <i>S. fredii</i>	Интенсивность роста штриха при конц. NaCl, М		
	0	0,005	0,4		0	0,005	0,4
648 а	3	3	1	ТБ-417	4	4	4
ТМ-411	2	2	1	ТБ-418	4	4	3
ТМ-442	4	4	1	ТБ-467	4	4	3
ММ-76	4	4	1	ТБ-491	4	4	3
ММ-111	4	3	1	МБ-119	4	4	3
СМ-46	2	2	0	СБ-43	4	4	3
БМ-60	4	3	1	ББ-69	3	4	3
ММ-96	3	3	1	ТБ-490	2	3	2

- 0 - нет роста
 1 - скудный рост
 2 — умеренный рост
 3 - хороший рост
 4 - обильный рост

В чашках Петри на агаризованной соевой среде МРС определяли сроки появления и размеры колоний коллекционных штаммов. Установлено, что колонии *B. japonicum* вырастают на 7-10 сутки после посева со средним размером колонии 3-6 мм, штаммы ризобий *S.*

fredii образуют колонии на 2-4 сутки после посева, диаметр колоний этих бактерий составляет 3-5 мм.

Из серии лабораторных опытов с жидкой и агаризованной средой Норриса с индикатором по изучению особенностей усвоения различных источников углеродного питания, можно заключить, что коллекционные штаммы, медленнорастущего вида *V. japoricum* в процессе жизнедеятельности усваивают ограниченный набор источников углерода (маннит, глюкоза), а штаммы быстрорастущего вида *S. fredii* - все источники углеродного питания (маннит, глюкоза, сахароза, мальтоза, лактоза).

Изучали особенности роста штаммов ризобий сои на нейтральной и щелочной (рН среды 7 и 8) питательной соевой среде МРС с индикатором при температурах выращивания 26 и 40° С. Штаммы *V. japoricum* хорошо росли на нейтральной среде МРС при температуре 26° С. При более высоких температурах (40° С) и на щелочных средах МРС эти штаммы не росли. Среди чистых культур ризобий сои *S. fredii* встречаются штаммы активно растущие на нейтральных и щелочных питательных средах при оптимальной и повышенной температурах (табл. 5).

Таблица 5

Особенности роста штаммов ризобий сои по среде МРС с различной рН и температурой выращивания на 12 сутки

Штаммы	рН - 7,0		рН-8,0	
	26° С	40° С	26° С	40° С
639 а*	3 щ	1 н	0	0
648 а*	3 щ	1 н	0	0
ББ-55	4 к	2 к	4 щ	0
МБ-85	4 н	0	4 щ	1 щ
ТБ-470	4 к	3 к	4 к	3 к
ТБ-475	4 к	3 к	4 щ	3 н

Условные обозначения: 0 - нет роста; 1 - скудный рост; 2 - умеренный рост; 3 - хороший рост; 4 - обильный рост; н - нейтральная среда; к - кислая; * - *V. japoricum*.

Одним из основных показателей характеристики штаммов является их вирулентность - способность образовывать клубеньки на корнях растения-хозяина.

Для того, чтобы составить представления о вирулентности изучаемой популяции, было испытано несколько сот штаммов, которыми инфицировали проростки сои. Проростки выращивали в больших пробирках с фильтровальной бумагой, пропитанной типовым раствором для растений.

При инокуляции проростков медленнорастущими штаммами показатель вирулентности был стабильно высоким и составил (80-100%) и не зависел от сроков хранения чистых культур. При изучении вирулентности штаммов быстрорастущего вида *S. fredii*, было установлено, что по сравнению с медленнорастущим видом *B. japonicum* эти штаммы обладают пониженной вирулентностью, а в процессе пересева отдельные штаммы *S. fredii* могут терять вирулентность. (Табл. 6)

Таблица 6

Вирулентность коллекционных штаммов ризобий сои,
выделенных в 1986 - 1998 годах

Штаммы <i>B. japonicum</i>	Годы выделе- ния	Количество клубеньков, шт./раст.		Виру- лент- ность, %	Штаммы <i>S. fredii</i>	Годы выделе- ния	Количество клубеньков, шт./раст.		Виру- лент- ность, %
		средн.	lim				средн.	lim	
ММ-48	1987	4,6	0-11	83	БД-32	1986	1,9	0-4	77
ОС-34	1988	4,1	0-10	80	ТБ-332	1989	5,0	0-11	80
ММ-96	1992	3,8	0-8	95	МБ-85	1991	4,5	0-9	85
ТМ-437	1994	5,3	0-11	93	ТБ-418	1993	1,9	0-8	57
БМ-53	1995	5,7	0-11	93	ББ-55	1995	0	0	0
ТМ-482	1997	7,8	1-15	100	МБ-119	1996	2,4	0-9	60
БМ-73	1998	5,1	0-11	86	ББ-71	1997	5,7	0-13	75

В опытах со стерильными и не стерильными семенами сои и других бобовых культур изучали возможности стимулирования прорастания и обеззараживания семян с помощью чистых культур ризобий сои. При посеве не стерильных семян разных бобовых культур по газону ризобий наблюдается задержка прорастания эпифитной микрофлоры, повышается всхожесть семян в среднем на 17%, возрастает

длина проростков в 2,2 раза. В опытах со стерильными семенами сои, где эпифитная микрофлора отсутствует, штаммы ризобий сои в разной степени стимулируют энергию прорастания и всхожесть посевного материала. В среднем, в опыте со стерильными семенами сои и штаммами ризобий энергия прорастания возросла в 5 раз, всхожесть семян на 8%, а масса проростков на 40% (Табл. 7).

Таблица 7

Особенности прорастания не стерильных семян зернобобовых культур выращиваемых по газону чистых культур ризобий сои

Бобовая культура	Вариант	Всхожесть, %	Длина проростка, см	Наличие микрофлоры
Соя, 2 сорта	к	98	3,0	+
	р	100	6,5	и
Горох, 2 вида	к	58	0,6	+
	р	68	1,9	и
Фасоль, 3 вида	к	74	2,8	+
	р	90	4,9	и
Маш	к	82	1,3	+
	р	95	2,6	и
Бобы	к	50	1,0	+
	р	84	2,1	и

Примечание: к - контроль, р - ризобий, и - нет инфекции на семенах, + - есть инфекция на семенах.

Кроме селекционной работы с ризобиями наша лаборатория занимается производством биопрепарата на основе лучших штаммов - клубеньковых бактерий сои для использования в хозяйствах Амурской области возделывающих сою.

Таким образом, коллекционные штаммы клубеньковых бактерий сои, выделенные из природной популяции ризобий, обладают разнообразными свойствами и представляют большой научный и практический интерес.