

4. Hoggard A. L. Effect of plant population on yield and height characters in determinate soybeans /Hoggard A.L., Grover Shannon J., Johnson D.R. // 1978. Agron. J., 70: – С. 1070–1073.

5. Lueschen, W. E. Influence of plant population on field performance of three soybean cultivars / Lueschen W. E., Hicks D. R. 1977 // Agron. J., 69: – С. 390–393.

УДК 576.8:631.4 (571.6)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ РИЗОБИЙ

М. В. Якименко, зав. лаб. биологических исследований канд. биол. наук; **С. А. Бегун**, вед. науч. сотр. канд. биол. наук; **А. И. Сорокина**, вед. науч. сотр. канд. вет. наук.

Лаборатория биологических исследований ФГБНУ «Всероссийский НИИ сои»

*В статье представлены данные многолетней работы лаборатории биологических исследований ФГБНУ ВНИИ сои (г. Благовещенск) по изучению дальневосточных природных популяций ризобий, в результате которой выявлено их видовое разнообразие, создана коллекция чистых культур клубеньковых бактерий сои видов *Bradyrhizobium japonicum* и *Sinorhizobium fredii*.*

Ключевые слова: ризобии, штаммы, виды, свойства, коллекция.

Дальневосточный регион является единственным в России и самым северным в мире ареалом распространения природных популяций ризобий сои. В течение длительного периода (1974–2017 гг.) в лаборатории биологических исследований ВНИИ сои создавалась уникальная коллекция чистых культур клубеньковых бактерий сои, представленная двумя родами *Bradyrhizobium* и *Sinorhizobium*.

Первые штаммы ризобий были выделены в чистую культуру из клубеньков культурной и дикорастущей сои юга Амурской области [1, 2]. С этого периода началось освоение методов аналитической селекции с клубеньковыми бактериями, отнесенными в тот период к роду *Rhizobium*. Осуществлялся подбор и усо-

вершенствование питательных сред для выращивания этих микроорганизмов. Разрабатывались различные методы оценки и идентификации штаммов ризобий выделенных в чистую культуру.

Длительное время считалось, что образование клубеньков на корнях сои происходит только одним видом клубеньковых бактерий – *Rhizobium japonicum* [3, 4]. Чистые культуры *R. japonicum* имели строгие параметры культуральных и биохимических свойств (не растут на МПА, относятся к медленнорастущей группе, щелочеобразующие) и все что выходило за рамки тех представлений о ризобиях сои, выбраковывалось. Только после появления (1982 г.) публикаций зарубежных исследователей стали меняться понятия о ризобиях, способных нодулировать сою [5, 6]. Из рода *Rhizobium* (Frank, 1889) было выделено два отдельных рода *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982) и *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988) [7]. Это послужило основанием, при выделении чистых культур из клубеньков сои, быстрорастущие формы ризобий относить к виду *Sinorhizobium fredii* (Scholla, Elkan, 1984), а медленнорастущие – к виду *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982). Поэтому массовое выделение чистых культур быстрорастущего вида клубеньковых бактерий сои из природных популяций было начато только в 1989 г., хотя первый быстрорастущий штамм клубеньковых бактерий, способный образовывать клубеньки на корнях сои, был выделен в чистую культуру сотрудником лаборатории С. А. Бегуном в 1978 г. [8]. К этому времени были отработаны многие методические вопросы по работе с новым видом соевых ризобий.

К настоящему периоду лабораторная коллекция включает свыше 200 наиболее ценных штаммов ризобий отнесённых нами к видам *Bradyrhizobium japonicum* и *Sinorhizobium fredii*, обладающих следующими свойствами: медленно- и быстрорастущие; щелоче- и кислотообразующие; солеустойчивые и солечувствительные; термоустойчивые (+37...+42°C); растущие при

оптимальной температуре выращивания (+26...+28 °С) и термочувствительные; растущие при рН 6–8; вирулентные и теряющие вирулентность в процессе пересевов; газообразующие; растущие на средах с повышенным содержанием солей молибдена, стимуляторами и протравителями семян; обладающие различной окраской и консистенцией.

96 % коллекционных штаммов *B. japonicum* обладают хорошим ростом штриха, а 73 % штаммов *S. fredii* обладают обильным ростом штриха семисуточной культуры на среде МРС с маннитом (табл. 1). Оценку окраски и консистенции проводили у 6-ти месячных чистых культур ризобий сои после их хранения в холодильнике при температуре +4°С. Замечено за этот период окраска и консистенция ризобиальной культуры проявляется более четко. Выявлено, что 80 % штаммов *B. japonicum* имеют беловатую окраску ризобиальной массы, а 17 % культур этого вида приобрели цвет топленого молока.

Таблица 1 – Культуральная характеристика коллекционных штаммов ризобий *B. japonicum* и *S. fredii* ВНИИ сои, 2012 г.

Показатели	<i>B. japonicum</i>		<i>S. fredii</i>	
	количество	в % к общему	количество	в % к общему
А) Интенсивность роста штриха	Семисуточная культура			
Скудный	0	0	0	0
Умеренный	2	1	1	1
Хороший	171	96	28	26
Обильный	6	3	79	73
Б) Окраска штриха	Шестимесячная культура			
Бесцветная	2	1	60	56
Слегка беловатого	0	0	27	25
Беловатая	142	80	12	11
Белая	0	0	7	6
Топленое молоко	31	17	1	1
Другие	4	2	1	1
В) Консистенция	Шестимесячная культура			
Водянистая	0	0	67	62

Пастообразная	177	99	28	26
Другая	2	1	13	12
Всего коллекционных штаммов	179	100	108	100

Чистые культуры ризобий вида *S. fredii* обладают более широким спектром окраски ризобияльной массы от бесцветного (56 % культур) до цвета топленого молока (1 % культур). 99 % чистых культур штаммов *B. japonicum* имеют пастообразную консистенцию, а 62 % штаммов *S. fredii* обладают водянистой консистенцией.

Многолетний опыт исследования дальневосточных природных популяций клубеньковых бактерий сои показал, что их видовой состав не ограничивается изучаемыми видами [9]. С целью поиска и отбора новых штаммов ризобий, нодулирующих сою, с 1999 г. на опытном участке лаборатории биологических исследований ВНИИ сои (луговые черноземовидные почвы) выращивали различные зернобобовые культуры. Наиболее активное и ежегодное образование клубеньков отмечено у сои, фасоли золотистой. У люпина, лобии и чечевицы образование клубеньков на корнях не происходило на протяжении трех лет наблюдений. У остальных зернобобовых культур (фасоль, горох, вигна, чина, нут, бобы, горох, арахис) образование клубеньков было неустойчивым. В 2012 г. из природных популяций Приамурья впервые были выделены в чистую культуру штаммы ризобий, образующие симбиотический аппарат не только у сои, но и у вигны двух видов (*V. radiata* и *V. unguiculata*) и фасоли золотистой. Проведено первичное изучение этой группы штаммов, выявлена их высокая вирулентность на сое (табл. 2).

Таблица 2 – Происхождение и некоторые свойства ризобий, выделенных в чистую культуру из клубеньков зернобобовых культур, выращиваемых на луговых чернозёмовидных почвах Амурской области

Происхождение	Штамм	Интенсивность	Рост	Клубенькообразование
---------------	-------	---------------	------	----------------------

ние, культура, сроки выделения	м	роста штриха на среде МРС с углеводами		на МПА	на сое	
		маннит	лактоза		количество, шт/раст.	вирулент., %
с. Садовое, вигна (<i>V. unguiculata</i>), к460 28 июля-15 августа 2012г.	Ву-2	3	3	+	3,6	90
	Ву-4	2	1	н	4,8	100
	Ву-5	4	4	н	2,1	70
с. Садовое. вигна (<i>V. unguiculata</i>), к463 15 августа 2012г.	Ву-6	3	1	н	3,0	80
	Ву-8	3	2	+	2,8	80
	Ву-9	3	4	+	1,9	60
	Ву-10	3	2	н	4,9	80
	Ву-11	3	3	+	3,7	90
с. Садовое, вигна (<i>V. radiata</i>), к3096 28 июля – 15 августа 2012 г.	Вр-1	2	2	н	5,2	90
	Вр-3	3	1	н	4,2	80
	Вр-4	3	2	н	4,9	100
	Вр-5	3	3	+	3,5	90
	Вр-9	3	2	н	3,9	70
с. Садовое, вигна (<i>V. radiata</i>), к 3098 28 июля – 15 августа 2012 г.	Вр-11	2	1	н	2,8	80
с. Садовое, фасоль золотистая (<i>P. aureus</i>), 15 августа 2012 г.	ФЗ-22	3	2	н	3,3	90
	ФЗ-23	4	4	+	2,8	80
	ФЗ-25	4	4	+	0,5	22
	ФЗ-27	4	3	н	0,9	30

Новые штаммы ризобий, выделенные в чистую культуру из клубеньков двух видов вигны и фасоли золотистой, дают рост штриха различной интенсивности на агаризованной среде МРС

с маннитом и лактозой. Так, штаммы ризобий Ву-2, Ву-6, Ву-9, Ву-11, Ву-12, Вр-5, ФЗ-23, ФЗ-25, ФЗ-27 дают одинаково хороший или обильный рост штриха бактериальной массы на среде МРС как с маннитом, так и лактозой. Штаммы ризобий Ву-4, Ву-6, Вр-3, Вр-11 хорошо растут на среде МРС с маннитом, но дают скудный рост штриха бактериальной массы на среде с лактозой и не растут на контрольной среде МПА. Выявлены штаммы ризобий, обладающие одинаково хорошим ростом штриха на средах МРС с маннитом и лактозой, но не растут на МПА (Ву-5, ФЗ-27).

Все штаммы ризобий, выделенные в чистую культуру из клубеньков вигны и фасоли золотистой в 2012 г. оказались вирулентными на сое (сорт Гармония). Наиболее высокая вирулентность (90–100 %) на сое оказалась у штаммов Ву-2, Ву-4, Ву-11, Вр-1, Вр-4, Вр-5, ФЗ-22.

В 2014–2015 гг. впервые из клубеньков гороха, фасоли, люпина, нута, бобов, чины и арахиса, выращиваемых на почвах Приамурья, выделено в чистую культуру 92 штамма ризобий. Клубеньки указанных культур были следующего вида: горох – кораллы, пальчики; фасоль – круглые, мелкие; люпин – белые, крупные, муфта; нут – грозди, крупные; бобы – разные: круглые, пальчики; чина – кораллы, пальчики; арахис – круглые, мелкие.

Осенью 2013 г. из Научно-исследовательского института сельского хозяйства, г. Магадан были получены образцы почвы из под бобовых культур (чина, мышинный горошек). Весной 2014 г. в лабораторных условиях семена сои, маша и вигны были посеяны в сосуды с почвой из Магадана. В фазу цветения (июнь 2014 г.) корневая система всех бобовых растений была осмотрена. Обнаружены клубеньки только на вигне (*V. radiata*, *V. unguiculata*). Из клубеньков вигны были выделены в чистую культуру 18 штаммов ризобий (табл. 3). Все штаммы ризобий с индексом Мд давали обильный и хороший рост штриха бактериальной культуры на агаризованной среде МРС с маннитом. На

питательной среде МРС с лактозой интенсивность роста штриха у этих штаммов ризобий несколько замедлилась. Только штамм Мд-6 давал одинаково обильный рост штриха бактериальной культуры на средах МРС с маннитом и лактозой.

Таблица 3 – Происхождение и некоторые свойства ризобий, выделенных в чистую культуру из клубеньков вигны

Происхождение, культура, сроки выделения	Штамм	Интенсивность роста штриха на среде МРС с углеводами		Рост на МПА	Клубенькообразование на сое	
		маннит	лактоза		количество, шт/раст.	вирулент., %
Почва из Магадана, предшественик Чина, вегетационный период опыт с вигной (<i>V. unguiculata</i>). 18 июня 2014 г.	Мд-0	4	2	+	0,3	22
	Мд-1	4	3	н	0,1	10
	Мд-2	4	3	н	0,2	10
	Мд-3	4	3	н	0	0
	Мд-4	3	3	н	0,1	10
	Мд-5	3	3	н	0	0
	Мд-6	4	4	н	0	0
	Мд-7	3	3	н	0	0
	Мд-9	4	3	н	0	0
	Мд-10	4	3	н	0,6	10
	Мд-11	4	3	н	0	0
Почва из Магадана, предшественик – мышинный горошек, вегетационный опыт с вигной (<i>V. radiata</i> , <i>V. unguiculata</i>) 25 июня 2014 г.	Мд-12	4	3	н	0	0
	Мд-14	4	3	н	1,2	30
	Мд-15	4	3	н	0,2	10
	Мд-16	4	3	н	0	0
	Мд-17	4	3	н	0	0
	Мд-18	4	3	н	0,5	20
	Мд-19	3	2	н	0,3	10
Почва из Сахалина, вег. опыт – вигна (<i>V. radiata</i>) К3098	Вр-31	2	2	-	2,6	80

Примечание. +- есть рост; н–нет роста; 1–скудный рост; 2–умеренный рост; 3–хороший рост; 4–обильный рост.

На контрольной среде МПА все выделенные штаммы с индексом Мд не растут, исключение составил штамм ризобий Мд-0.

При определении вирулентности штаммов ризобий с индексом Мд выявлено слабое клубенькообразование (0,1–1,2 клубенька) на сое (сорт Гармония) или её отсутствие.

В августе 2015 г. а был получен образец почвы из г. Ю-Сахалинска. В контейнер с почвой были высеяны семена сои (сорт МК 100), фасоли золотистой и вигны (*V. radiata*, к 3098).

Клубеньки образовались только на корнях вигны. Из клубеньков вигны выделен в чистую культуру штамм ризобий Вр-31 и оставлен в коллекции для дальнейшей работы. Этот штамм давал умеренный рост бактериальной массы на среде МРС с маннитом и лактозой, образовывал клубеньки на сое сорта Хабаровская 4 и показал 100 % вирулентность на фасоле золотистой.

Выделенные штаммы показали различную интенсивность роста на агаризованной среде МРС с маннитом и лактозой. Эти штаммы проверены по показателям роста на контрольной среде МПА. Большинство штаммов ризобий, выделенных в чистую культуру из почв Амурской, Магаданской и Сахалинской областей оказались вирулентными на сое.

Таким образом, в результате многолетней работы по изучению дальневосточных природных популяций ризобий была создана уникальная коллекция чистых культур этих микроорганизмов, представленная двумя родами *Bradirhizobium* и *Sinorhizobium*, выявлено их видовое разнообразие.

Литература

1. Якименко, М. В. Основные направления исследований дальневосточных природных популяций ризобий / М. В. Якименко, С. А. Бегун // Вестник ДВО РАН. – Владивосток, 2016. – С. 45–49.

2. Бегун, С. А. Влияние клубеньковых бактерий на продуктивность сои в районах давнего соосеяния: Автореф. дис. ... канд. б. наук. – Ленинград, 1983.– 180 с.

3. Rhizobiaceae молекулярная биология бактерий взаимодействующих с растениями / пер. с англ. под ред. И.А. Тихоновича и Н.А. Проворова. Санкт-Петербург: ООО «ИПК «Бионт», 2002. – 567 с.

4. Новикова Н. И. Современные представления о филогении и систематике клубеньковых бактерий / Н. И. Новикова // Микробиология. 1996. – Том 65. – № 5. – С. 437–450.

5. Keyser, H. H. Fast – growing rhizobia isolated from root nodules of soybean / H. H. Keyser, B. Bohlool, T. S. Hu, D. E Weber // Science. – 1982. – Vol. 215. – P. 1631–1632.

6. Jordan, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum*, Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria of leguminous plants / D. C. Jordan // Internat. J. System. Bacteriol. – 1982. – Vol. 32, № 1. – P. 136–139.

7. Scholla, M. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fastgrowing species that effectively nodulates soybeans / M. Scholla, G. H. Elkan // Internat. J. System. Bacteriol. – 1984. – Vol. 34. – № 4. – P. 484–486.

8. Бегун, С. А. Быстрорастущие формы клубеньковых бактерий сои в почвах Приамурья / С. А. Бегун, В. А. Тильба // Бюл. ВИР. – Санкт-Петербург, 1992. – Вып. 220. – С. 78–85.

9. Тильба В. А. Природные популяции ризобий сои и их использование в соевых агроценозах / В. А. Тильба, С. А. Бегун, М. В. Якименко // Инновационная деятельность аграрной науки в Дальневосточном регионе: сб. научн. тр. / Владивосток. 2011. – С. 95–102.

УДК 631.531.16533:58.036

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ ПЛАЗМЫ ДЛЯ ПРЕДПОСЕВНОЙ БИОАКТИВАЦИИ СЕМЯН СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

Л. А. Каманина, вед. науч. сотр. лаборатории первичного семеноводства и семеноведения канд. с.-х. наук; **В. Т. Синеговская**, директор акад. РАН, д-р с.-х. наук, проф.; **Е. Н. Комогорцева**, лаборант-исследователь лаборатории земледелия, агрохимии и защиты растений.

ФГБНУ «Всероссийский НИИ сои»