УДК 633.853.52:632.484

DOI 10.25230/2412–608X–2018–4–176–78–83

Использование различных углеводов и проявление свойств вирулентности ризобиями сои, обитающими в кубанском черноземе

В.А. Тильба,

доктор биологических наук, академик РАН

Н.М. Тишков,

доктор сельскохозяйственных наук

Д.А. Курилова,

кандидат биологических наук

М.В. Шкарупа,

младший научный сотрудник

ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17

Тел.: (861) 254–13–59, 8–918–290–01–42

E-mail: agrohim@vniimk.ru

Для цитирования: Тильба В.А., Тишков Н.М., Курилова Д.А., Шкарупа М.В. Использование различных углеводов и проявление свойств вирулентности ризобиями сои, обитающими в кубанском черноземе // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2018. – Вып. 4 (176). – С. 78–83.

Ключевые слова: соя, клубеньковые бактерии, ризобии, источники углеводов, клубеньки, вирулентность, сахара, слизеобразование, штаммы.

Изучали штаммовые особенности ризобий сои, выделенных из почв Краснодарского края (6 культур) и из почв Амурской области (2 культуры) в лабораторных опытах. Устанавливали интенсивность слизеобразования на различных источниках углеводов (галактозе, глюкозе, мальтозе, сахарозе и манните). Кроме того, учитывали образование клубеньков у сортов сои Славия и Вилана при выращивании стерильных проростков на агаризованной среде. Сравнивали эффективность девяти штаммов (в чистой культуре) по признаку образования клубеньков в фазе разворачивания первого тройчатого листа. Корневая система сохранялась в антисептических условиях. Штаммы кубанского происхождения 1п, 7б и 8п характеризуются слабым слизеобразованием на средах с галактозой и глюкозой и достаточно интенсивным слизеобра-

зованием в вариантах с сахарозой и маннитом. У сорта Вилана наибольшее количество клубеньков образовали штаммы 6/1, 7б, 1п и 2п. Максимальные показатели этого признака у сорта Славия выявлены в вариантах с культурами 3–4п, 6 и 8п. Ризобии, образующие сравнительно мало слизи при росте на средах с галактозой и глюкозой, образуют относительно больше клубеньков у каждого изучавшегося сорта.

UDC 633.853.52:632.484

Usage of the different carbohydrates and demonstration of virulence by soybean rhizobia inhabiting Kuban black soils

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

N.M. Tishkov, doctor of agriculture

D.A. Kurilova, PhD in agriculture

M.V. Shkarupa, junior researcher

All-Russian Research Institute of Oil Crops by

Pustovoi V.S. (VNIIMK)

17, Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia

Tel.: (861) 254-13-59, 8-918-290-01-42

E-mail: agrohim@vniimk.ru

Key words: soybean, tubercle bacteria, rhizobia, sources of carbohydrates, tubercles, virulence, sugars, mucus production, strains.

We studied strain features of soybean rhizobia which were isolated from soils of the Krasnodar (six cultures) and Amur regions (two cultures) in laboratory. We stated intensiveness of mucus production on the different carbohydrates (galactose, glucose, maltose, sucrose and mannite). Besides that, we accounted tubercles formation in soybean cultivars Slavia and Vilana at cultivation of sterile seedlings in agar medium. We compared efficiency of nine strains (in a clear culture) by a trait 'tubercles formation' in a phase of first trifoliate leaves development. A root system was kept in antiseptic conditions. The strains of Kuban origin 1p, 7b and 8p are characterized by a weak mucus production on mediums with galactose and glucose, and by intensive enough on sucrose and mannite. The strains 6/1, 7b, 1p and 2p formed the maximal quantity of tubercles on the cultivar Vilana. The cultivar Slavia showed the maximal meanings of this trait with cultures 3–4p, 6 and 8p. Rhizobia forming comparatively little amount of mucus at the growing on galactose and glucose formed relatively more tubercles for each studied cultivar.

Введение. В Центральной, Южно-Предгорной и Западной зонах Краснодарского края посеvy сои достигают 70–75 и 35,5 тыс. га [3].

Можно полагать, что распространение в изучаемых почвах *Bradyrhizobium japonicum*, а также, возможно, *Rhizobium fredii*, обусловлено систематической обработкой посевного материала бактериальными удобрениями инорайонного происхождения. При этом использовались препараты ризобий из ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, с Дальнего Востока, а также из Франции, Канады, Испании, Аргентины, Испании и Бразилии [1; 8]. В такой ситуации в формировании популяции клубеньковых бактерий может участвовать большое количество штаммов (кластеров).

Вместе с тем, по данным Клыкова А.П. [2], Садовского М. [7], Тильбы В.А. [8] появление специфичных ризобий не всегда связано с искусственной модуляцией. Через 4–5 лет после постоянного возделывания сои, вне зависимости от других факторов, в почве может нарастать численность клубеньковых бактерий доминирующей бобовой культуры. Из этого следует, что популяция ризобий сои является достаточно многоплановым образованием и в большинстве случаев представляет собой поликлональную структуру.

Изучение физиолого-биохимического потенциала ризобий сои в кубанских черноземах позволяет прогнозировать активность симбиотической азотфиксации в посевах культуры и потребность воздействия на указанный фактор с помощью бактериальных препаратов. С этой целью было выделено свыше 10 штаммов клубеньковых бактерий, обитающих в изучаемых почвах. Проведено сравнительное исследование их реакции на различные источники углеводов в чистой культуре и проявление вирулентности отдельных штаммов при выращивании растений, корневая система которых находилась в стерильных условиях.

Материалы и методы. Все опыты проводили в лабораторных условиях. Изучались сорта сои Вилана и Славия.

Сорт сои Вилана среднеспелый, созревает за 117–120 суток, содержание белка в семенах 40–41 %, масла – 22–23 %.

Сорт сои Славия – скороспелый, вегетационный период в среднем 98–100 суток, содержание белка 40–41 %, масла – 23–24 %.

Для изучения закономерностей образования клубеньков семена сои стерилизовали концентрированной серной кислотой и промывали стерильной водой. Стерилизованные

семена проращивали в чашках Петри на голодном агаре. Для опыта отбирали выровненные стерильные «наклонившиеся» семена, которые помещались в пробирки ёмкостью 80 мл, заполненные агаризованной средой Гельригеля, не содержащей соединений азота. Одновременно в каждую пробирку вносили 1 мл взвеси чистых культур изучавшихся штаммов клубеньковых бактерий сои (до 1,2 млн клеток в 1 мл).

Всего использовали 9 штаммов ризобий. Из них штаммы 1п, 2п, 3–4п, 7б, 7п, 8п выделены нами из клубеньков сои, выращенной на кубанском выщелоченном черноземе. Штаммы 5/1, 6 и 6/1 выделены из клубеньков сои, выращенной на почвах Амурской области.

При достижении проростками сои верхней кромки пробирки, стебли обкладывали стерильной ватой, и далее корневая система находилась в антисептических условиях. Повторность 6-кратная. Продолжительность опыта 20–23 суток.

Характер роста исследуемых штаммов ризобий изучался на питательной среде следующего состава (в граммах на 1 л воды): K_2HPO_4 – 0,5; KH_2PO_4 – 0,5; $MgSO_4$ – 0,1; $CaSO_4$ – 0,1; $NaCl$ – 0,2; молибденово-кислый аммоний – следы, агар-агар – 20; дрожжевой автолизат – 10 мл. В качестве источника углерода в среду добавляли маннит, галактозу, мальтозу, сахарозу (20 г/л).

Через 2–7 дней учитывали показатели развития колоний (штриха) на косом срезе: интенсивность развития колоний, консистенцию, слизееобразование, появление пузырьков, цветовые оттенки бактериальной массы.

Результаты и обсуждение. При выращивании на различных источниках углерода большинство изучаемых штаммов продемонстрировали интенсивное слизееобразование (табл. 1). Такое свойство нередко присуще клубеньковым бактериям, вступающим в мутуалистические взаимоотношения с бобовыми культурами.

Среди штаммов ризобий сои такое свойство наблюдается как у медленно-, так и у быстрорастущих форм.

Изучаемые нами штаммы 1п, 3–4п и 8п при росте на средах с галактозой, глюкозой и мальтозой не образуют большого количества слизи. В то же время штамм 2п при росте на всех испытывавшихся сахарах и манните продуцировал большое количество этой субстанции.

Табл. 1

Штаммы 7б и 7п слабо росли на средах с галактозой и глюкозой. В остальных вариантах слизиобразование характеризуется как высоко- или среднеинтенсивное.

Штаммы 1п, 7б и 8п при использовании сахаров и маннита слизи не образуют или образуют сравнительно немного.

В отличие от штаммов, выделенных из почв Краснодарского края, ризобии амурского происхождения (5, 6, 6/1) на всех источниках углеводов образуют большое количество слизи.

Темпы образования слизистой массы во многом зависят от степени утилизации углеводов. В этом отношении штаммы амурского происхождения при использовании всех изучавшихся источников энергетического материала (включая дисахара) проявляют высокую интенсивность слизиобразования. Некоторые бактериальные формы, выделенные из кубанского чернозема (штаммы 1п, 7б, 7п и 8п), сравнительно мало слизи образовали в варианте с галактозой. Такое явление обычно присуще медленнорастущим ризобиям [4]. Это же свойственно штамму 3–4п в вариантах с глюкозой, галактозой и мальтозой. Вместе с тем хорошо выраженным данный показатель оказался при использовании сахарозы и маннита.

Штаммы 5/1, 6 и 6/1 изначально отнесены к различным группам по интенсивности роста на плотной питательной среде. Так, форма 5/1 характеризуется как быстроразвивающаяся. Несмотря на это, бактериальные изолянты ризобий, выделенные из почв Приамурья, с высокой интенсивностью использовали все изучавшиеся источники углеводов и образовывали много слизи через 6–7 суток после посева.

Штамм кубанского происхождения 2п давал малозаметный рост на среде с галактозой и демонстрировал высокую интенсивность слизиобразования на других источниках углеводов.

Сахара и маннит, используемые бактериальной клеткой, в первую очередь вовлекаются в интенсивный конституционный рост (включая сопряженные окислительно-восстановительные реакции). Различия в темпах образования слизи на изучавшихся источниках углеводов свидетельствуют о заметных штаммовых (физиологических) особенностях анализируемых бактериальных культур. Как указывают Мишустрин Е.Н. и

Шильникова В.К. [4], способность использовать источники углерода во многом определяется физиологией штаммов и может быть связана с особенностями ферментативного комплекса, участвующего в превращении углеводов [5; 6].

Интенсивность образования слизи и окраска колоний изучавшихся культур достаточно однообразна и в основном свойственна типичным показателям ризобий сои. Различия изучаемых свойств позволяют судить об уровне их изменений.

Еще одним показателем пределов изменчивости штаммов может являться свойство вирулентности, определяемое у растений сои, выращенных в условиях с сохранением стерильной корневой системы. В таблице 2 приведены данные о количестве клубеньков и пределы колебаний этого показателя у сортов сои Вилана и Славия в фазе разворачивания первого тройчатого листа (среднее из нескольких лабораторных опытов).

Таблица 2

Количество клубеньков, обнаруженных на корнях сои, бактериализованных различными штаммами ризобий при выращивании в антисептических условиях

Ризобии сои	Количество клубеньков в расчете на 1 растение (среднее из 6 опытов)	
	сорт Вилана	сорт Славия
1п	3,0 ± 2,0	1,0 ± 0,5
2п	3,0 ± 1,0	5,0 ± 1,4
3–4п	2,0 ± 0,5	12,0 ± 2,3
5/1	1,0 ± 1,0	1,2 ± 0,3
6	2,2 ± 1,5	7,0 ± 1,6
6/1	4,0 ± 1,1	1,0 ± 0,3
7б	4,0 ± 2,1	3,0 ± 1,0
7п	1,0 ± 0,3	6,0 ± 2,1
8п	1,5 ± 0,2	7,0 ± 2,0
Индекс образования клубеньков	2,4 ± 1,2	4,8 ± 1,3

У сорта Славия наибольшее количество клубеньков образовали штаммы 6/1, 7б, 1п и 2п. Невысокую активность в этом процессе проявили ризобии в вариантах с бактериальными культурами 5/1, 7п и 8п. По отношению к сорту Славия максимальные результаты продемонстрировали штаммы 2п, 3–4п, 6 и 8п. Сравнительно мало клубеньков у растений образовались при инокулировании изолятами 1п, 5/1 и 6/1.

По индексу образования клубеньков сорт Славия в фазе первого тройчатого листа в 2 раза превосходил сорт Вилана. Объясняется

это тем, что первый сорт скороспелый, его вегетационный период составляет 98–100 дней. Поэтому процесс формирования корней и склонность к образованию клубеньков у данного сорта проявляется на первых этапах роста заметнее, чем у среднеспелого сорта Вилана (вегетационный период 117–120 дней).

Указанная закономерность проявляется в рамках свойств каждого штамма. В первую очередь показатель количества клубеньков характеризует вирулентность ризобий. По отношению к сорту Вилана свойство вирулентности в изучаемую фазу изменяется в пределах 1–4 клубенька в расчёте на 1 растение. У сорта Славия этот показатель колеблется от 1 до 12.

Вне зависимости от сортовых особенностей, только два штамма проявили достаточно устойчивые показатели вирулентности (2п и 7б) на первоначальном этапе роста растений. Соответственно по сортам количество клубеньков (в вариантах с указанными штаммами) составляет 3–4 и 3–5 на 1 растение. Штамм 2п характеризуется слабым образованием слизи при выращивании на среде с галактозой и обильным слизеобразованием на всех других источниках углеводов. Штамм 7б на галактозе образует штрих с наибольшим количеством слизи. В других вариантах отмечается аналогичное состояние штриха. Следовательно, штамм 2п по ряду показателей проявляет признаки ускоренно растущего, а штамм 7б – развивающегося замедленно.

При определении вирулентности установлено, что в фазе первого тройчатого листа по отношению к сорту Вилана изучавшиеся штаммы продемонстрировали высокую активность – 90–97 % (табл. 3). У штаммов 1п и 5п в указанной ситуации вирулентность составляла 60 и 63 %.

Таблица 3

Вирулентность клубеньковых бактерий по отношению к сортам сои Вилана и Славия

Сорт	Повторность	Вирулентность штаммов										НСР ₀₅
		1п	2п	3–4п	5/1	6	6/1	7б	7п	8п		
Вилана	I	61	88	96	71	89	92	94	98	81	18,95	
	II	65	96	88	49	99	96	90	96	99		
	среднее	63	93	92	60	94	94	92	97	90		
Славия	I	91	96	88	94	98	99	96	97	98	10,15	
	II	97	90	98	90	90	95	92	89	94		
	среднее	94	93	93	92	94	97	94	93	96		

У сорта Славия на первых этапах развития взаимодействие с ризобиями находится на более высоком уровне, и вирулентность составляет 93–97 %. Следует отметить, что у данных сортов образование клубеньков зависит также и от продолжительности светового дня.

Выводы. 1. Штаммы ризобий сои, выделенные из кубанского чернозема при выращивании в агаризованной культуре при различных источниках углевода (галактоза, глюкоза, мальтоза, сахароза, маннит) образуют хорошо заметный штрих через 3–7 суток после посева. В большинстве случаев ризобии формируют крупные слизистые колонии, бесцветные или с матовым, серым оттенком.

2. Штаммы кубанского происхождения 1п, 7б и 8п характеризуются слабым слизеобразованием, особенно в вариантах с галактозой и глюкозой. В отличие от аборигенных культур, штаммы, выделенные из почв Амурской области (5/1, 6, 6/1), на всех источниках углеводов росли с образованием большого количества слизи. Бактериальные культуры 1п, 7б и 8п частично проявляют свойства медленно растущих форм. В вариантах со штаммами 3п и 7п слабое слизеобразование наблюдалось при выращивании на среде с галактозой и глюкозой, но бурный рост на среде с сахарозой и маннитом.

3. Выявлены некоторые сортовые различия у растений сои по образованию клубеньков при выращивании корневой системы в стерильных условиях. У сорта Вилана наибольшее количество клубеньков образовывали штаммы 6/1, 7б, 1п и 2п. У сорта Славия максимальным этот же показатель оказался в вариантах с формами 3–4п, 6, 8п. По индексу образования клубеньков в фазе первого тройчатого листа скороспелый сорт Славия в два раза превосходил сорт Вилана.

4. Ризобии, демонстрирующие ограниченный рост на галактозе и, частично, на глюкозе, образуют относительно повышенное количество клубеньков у каждого изучавшего сорта. Исключения составляют штаммы 6 и 6/1.

Список литературы

1. Енкина О.В. Влияние нитрагина на урожайность и качество зерна сои // Краткий отчет о научно-исследовательской работе ВНИИЭМК за 1961–1962 гг. – Краснодар, 1964. – С. 185–187.

2. Клыков А.П. Появление клубеньковых бактерий в связи с акклиматизацией сои в нечерноземной полосе // Агробиология. – 1956. – № 6. – С. 70–73.

3. Кривошлыков К.М. Организационные и инновационные аспекты развития производства подсолнечника и сои в Краснодарском крае // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – Краснодар, 2017. – Вып. 4 (172). – С. 106–112.

4. Мишустин Е.Н., Шильников В.К. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. – М.: Наука, 1973. – 240 с.

5. Martinez C.J., Torrie J.N., Allen O.N. Correlation analysis of criteria of symbiotic nitrogen fixation by soybeans (*Glycine max* Merr.) // Zentralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg. – 1970. – No 124 (3). – P. 212–216.

6. Martinez-Romero E. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy // Plant and Soil. – 1994. – No 161. – P. 11–20.

7. Садовски М., Грэм П. Почвенная биология Rhizobiaceae // В сб.: Rhizobiaceae – молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Под ред. Г. Спайк, А. Кондорози, П. Хукас; рус. ред. И.А. Тихоновича и Н.А. Проворова. – СПб, 2002. – С. 179–197.

8. Тильба В.А., Тишков Н.М., Шкарупа М.В. Особенности формирования симбиотического аппарата у среднеспелых сортов сои на выщелоченном чернозёме Краснодарского края // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2017. – Вып. 4 (172). – С. 72–78.

2. Klykov A.P. Poyavleniye kluben'kovykh bakteriy v svyazi s akklimatizatsiyey soi v nechernozemnoy polose // Agrobiologiya. – 1956. – №:6. – S. 70–73.

3. Krivoshlykov K.M. Organizatsionnyye i innovatsionnyye aspekty razvitiya proizvodstva podsolnechnika i soi v Krasnodarskom kraye // Maslichnyye kul'tury. Nauch.-tekhn. byul. VNIIMK. – 2017. – Vyp. 4 (172). – S. 106–112.

4. Mishchustin E.N., Shil'nikova V.K. Kluben'kovyye bakterii i inokulyatsionnyy protsess. – M.: Nauka, 1973. – 240 s.

5. Martinez C.J., Torrie J.N., Allen O.N. Correlation analysis of criteria of symbiotic nitrogen fixation by soybeans (*Glycine max* Merr.) // Zentralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg. – 1970. – № 124 (3). – P. 212–216.

6. Martinez-Romero E. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy // Plant and Soil. – 1994. – № 161. – P. 11–20.

7. Sadovskiy M., Grem P. Pochvennaya biologiya Rhizobiaceae // V sb.: Rhizobiaceae – molekulyarnaya biologiya bakteriy, vzaimodeystviyushchikh s rasteniyami / Pod red. G. Spayk, A. Kondoroshi, P. Khukas; rus. red. I.A. Tikhonovicha i N.A. Provorova. – Sankt-Peterburg, 2002. – S. 179–197.

8. Til'ba V.A., Tishkov N.M., Shkarupa M.V. Osobennosti formirovaniya simbioticheskogo apparata u srednespelykh sortov soi na vyshchelochennom chernozёme Krasnodarskogo kraya // Maslichnyye kul'tury. Nauch.-tekhn. byul. VNIIMK. – 2017. – Vyp. 4 (172). – S. 72–78.

References

1. Enkina O.V. Vliyaniye nitragina na urozhaynost' i kachestvo zerna soi: Kratkiy otchet o nauch.-issled. rabote VNIIMK za 1961–1962 gg. – Krasnodar, 1964. – S. 185–187.

Получено: 23.10.2018

Received: 23.10.2018

Принято: 06.11.2018

Accepted: 06.11.2018