

ЕФЕКТИВНІСТЬ РІЗНИХ СПОСОБІВ ІНОКУЛЯЦІЇ СОЇ БУЛЬБОЧКОВИМИ БАКТЕРІЯМИ

Маліченко С.М., Даценко В.К., Маменко П.М., Коць С.Я.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
вул. Васильківська, 31/17, м. Київ, 03022, Україна
E-mail: mamenko@ifrg.kiev.ua

*Досліджено ефективність передпосівної інокуляції сої бульбочковими бактеріями за безпосередньої бактеризації посівного матеріалу та при внесенні інокулюму в ґрунт під передпосівну культивуацію, а також здатність ризобій, що залишилися в ґрунті, вступати в наступному році в ефективний симбіоз із соєю. У роботі використано рідкі бактеріальні культури виробничого штаму *Bradyrhizobium japonicum* 6346 та трьох перспективних Tn5-мутантів *B. japonicum* 646. Внесення в ґрунт бактеріальних суспензій виявилось ефективнішим в обидва роки досліджень, порівняно з інокуляцією насіння, про що свідчить більша кількість утворених кореневих бульбочок, вища їх нітрогеназна активність і більша врожайність зерна сої. Из-поміж трьох досліджуваних транспозонових мутантів два виявились ефективнішими за штамп-стандарт.*

Ключові слова: інокуляція, бульбочкові бактерії, соя, Tn5-мутанти, ефективність симбіозу.

Представники родів бульбочкових бактерій *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mezorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* і *Allorhizobium* – це не звичайні ґрунтові мікроорганізми, оскільки окрім стану вільноіснуючих гетеротрофів, їхньому життєвому циклу притаманна також стадія симбіотичної взаємодії з бобовими рослинами, яка розпочинається з моменту проникнення цих мікроорганізмів у кореневі волоски і перетворення у симбіотичну форму – бактероїди.

У ґрунтах України, де традиційно вирощують горох, люцерну, конюшину, існують природні популяції відповідних цим культурам бульбочкових бактерій, чисельність яких досягає 10^4 - 10^6 клітин на 1 г ґрунту [9]. Експериментальні дані показали, що успішна інокуляція бобових відбувається тоді, коли титр бульбочкових бактерій складає не менше 10^4 клітин на 1 г ґрунту [10]. Якщо ж бобову

рослину, наприклад, сою, висівають уперше у нетрадиційному для її вирощування регіоні, то специфічні їй ризобії у ґрунті у цей час повністю відсутні. Тому для ініціації процесу фіксації азоту в даному випадку необхідно проводити інокуляцію інтродукованих рослин ефективними штамми бульбочкових бактерій.

Відомо, що ризобії можуть потрапляти в ґрунт у складі комерційних інокулянтів, розповсюджуватися повітрям, із насінням або культивуватись як симбіонти місцевих бобових рослин. При передпосівній інокуляції бобових рослин кількість бульбочкових бактерій, що потрапляють у ґрунт, залежить від розміру насіння, густоти посівів та методу інокуляції. Високоякісні інокулянти забезпечують потрапляння не менше, ніж 2×10^3 клітин бактерій на одну насінину [1]. Із плином часу кількість ризобій у ґрунті швидко зростає за рахунок їх вивільнення із бульбочок, що відмирають після закінчення вегетації бобових рослин. У багатьох випадках це забезпечує домінування штамів-інокулянтів впродовж 5-15 років після першої, вихідної інокуляції [8, 12]. Ризобії складають відносно невелику частину ґрунтової мікробіоти – від 0,1 до 0,8 % загальної її чисельності. Проте, деякі ґрунтові бактерії, які не відносяться до родини *Rhizobiaceae*, або невірулентні ризобії, можуть набувати здатності до бульбочкоутворення при перенесенні в них под-генів [13, 14].

Існують два способи інокуляції ризобіями бобових – обробка бактеріями посівного матеріалу і внесення інокулюму безпосередньо в ґрунт. Оптимальним вважається перший спосіб [3]. Літературних посилань стосовно ефективності бактеризації ризобіями бобових шляхом інокуляції ґрунту нам відомо небагато. Зокрема, відомо [7, 12, 13], що внесення в ґрунт препарату бульбочкових бактерій в районах традиційного вирощування бобових культур забезпечує суттєвий приріст урожайності, а саме: зерна сої – на 2-4, зерна гороху і люпину – на 1-2, зеленої маси бобових багаторічних трав – на 80-100 ц/га. При цьому ефективність даного заходу залежить як від виду бобової рослини, так і від усього комплексу агротехнічних і екологічних умов.

Оскільки передпосівна інокуляція сої активними штамми бульбочкових бактерій, особливо при вирощуванні в нетрадиційних для неї регіонах, є надзвичайно важливим агротехнічним заходом, завданням наших досліджень було вивчення ефективності двох способів бактеризації, а саме, інокуляції насіння і безпосереднього

внесення інокуляційної суспензії в ґрунт під передпосівну культивуацію ріллі. Іншим нашим завданням було з'ясування необхідності передпосівної інокуляції ризобіями сої при повторному її висіванні на одному і тому ж полі.

Матеріали і методи. Для порівняння ефективності різних способів іноуляції сої окремими формами ризобій була вибрана земельна ділянка, на якій дана культура раніше ніколи не вирощувалась. Іншими об'єктами вивчення слугували отримані нами Tn5-мутанти *Bradyrhizobium japonicum* 646 – T66, 118 і 3-11 [4-6], а також виробничий штаб 634б.

Насіння сої сорту Мар'яна перед посівом стерилізували 75%-ним етанолом і промивали у проточній воді. Половину загальної кількості насіння, необхідного для засівання всієї дослідної ділянки, поділили на 4 частини, кожна з яких проінокулювали взятими для дослідів формами ризобій. Адекватну кількість суспензії ризобій вносили перед посівом у ґрунт відповідних ділянок. При вивченні ефективності обох способів інокуляції користувалися бактеріальною суспензією однакової оптичної густини – 10^8 клітин в 1 мл. Насіння висівали із розрахунку 600 тис. схожих насінин на гектар. Азотфіксувальну активність вимірювали ацетилен-відновлювальним методом [11], математичну обробку результатів здійснювали за Б.А. Доспеховим [2].

Результати та їх обговорення. Результати обліку кількості корневих бульбочок, утворених у процесі вегетації сої в обидва роки досліджень, які характеризують вірулентність досліджуваних форм *B. japonicum*, надано в табл. 1. Помітно, що всі транспозонові мутанти, так само як і виробничий штаб 634б, доволі вірулентні, про що свідчить оптимальна кількість ініційованих ними бульбочок. Порівнюючи інтенсивність нодуляції при застосуванні різних способів бактеризації, можна відзначити, що у перший рік досліджень напочатку цвітіння сої особливої різниці за цим показником не спостерігається. Пізніше, у фазу плодоутворення і в наступному році дослідження, більше бульбочок на кореневій системі сої утворювалось при внесенні інокулюму безпосередньо в ґрунт під передпосівну культивуацію, що можна пояснити більшим поширенням ризобій у ризосфері сої, завдяки застосуванню цього способу порівняно з інокуляцією насіння.

Таблиця 1. Інтенсивність утворення корневих бульбочок сої залежно від способу та часу інокуляції *Bradyrhizobium japonicum* (од./росл.)

Інокулянт	Спосіб інокуляції	Виробнича інокуляція, 2007 р.		Спонтанна інокуляція, 2008 р.	
		початок цвітіння	початок плодоутворення	початок цвітіння	початок плодоутворення
Штам 634б	грунт	39±4	58±8	59±6	80±13
	насіння	50±8	42±4	45±5	70±10
Тп5-мутант Т66	грунт	41±3	70±4	66±6	91±14
	насіння	50±7	50±4	47±4	77±8
Тп5-мутант 118	грунт	20±3	29±6	102±19	107±15
	насіння	11±2	16±3	82±9	82±10
Тп5-мутант 3-11	грунт	30±2	90±12	82±4	194±18
	насіння	50±5	75±5	68±3	135±13

Було помічено також, що час появи бульбочок як у перший, так і другий рік досліджень залежав від способу інокуляції. Бульбочки формувалися дещо раніше за умови інокуляції насіння, а при внесенні інокуляційної суспензії в ґрунт спостерігалась тенденція до розташування бульбочок на головному корені трохи нижче, ніж при безпосередній інокуляції насіння.

Стосовно наростання вегетативної маси сої в залежності від інокулянта і способу внесення ризобій у ґрунт можна відзначити, що більша вегетативна маса сої була сформована при використанні для інокуляції Тп5-мутантів Т66 і 3-11. Однак, певної залежності між наростанням маси рослин і способом інокуляції не виявлено, за винятком того, що у 2007 р. при інокуляції ґрунту формувалась більша маса рослин напочатку плодоутворення за дії штаму 634б та Тп5-мутантів Т66 і 3-11.

У перший рік досліджень (2007 р.) динаміка азотфіксувальної активності бульбочок сої мала таку ж закономірність, як і динаміка наростання маси рослин. Так, у фазу початку утворення бобів (табл. 2) спостерігалась тенденція до збільшення рівня азотфіксації

при внесенні ризобій у ґрунт. Відповідно, це стосується також і досліджень 2008 р., де як загальна, так і питома азотфіксувальна активність спонтанно утворених бульбочок була дещо вищою при внесенні інокулянта в ґрунт у перший рік досліджень (рис. 1 і 2).

Таблиця 2. Нітрогеназна активність бульбочок сої в залежності від способу інокуляції *V. japonicum*, мкмоль C_2H_4 /(рослину · год)

Інокулянт	Спосіб інокуляції	Виробнича інокуляція, 2007 р.		Спонтанна інокуляція, 2008 р.	
		початок цвітіння	початок плодоутворення	початок цвітіння	початок плодоутворення
Штам 6346	ґрунт	138,77±2,72	210,61±19,39	92,47±10,16	62,85±8,84
	насіння	126,98±7,93	183,32±17,59	68,29±9,57	77,64±10,10
Тп5-мутант Т66	ґрунт	106,89±4,22	243,48±13,88	125,27±1,94	82,16±15,98
	насіння	109,32±5,21	217,58±4,50	97,35±0,99	85,92±8,00
Тп5-мутант 118	ґрунт	14,99±1,63	39,87±10,83	42,21±6,31	60,20±19,65
	насіння	2,84±0,40	21,55±3,04	63,41±16,53	61,57±8,33
Тп5-мутант 3-11	ґрунт	89,15±5,54	200,01±18,24	111,74±10,34	99,29±12,68
	насіння	92,54±4,51	179,33±14,96	82,15±7,32	75,83±7,03

Результати обліку врожайності зерна сої (табл. 3) переконливо свідчать про переваги допосівного внесення бактеріальної суспензії в ґрунт у порівнянні з інокуляцією насіння. Збільшення врожайності при застосуванні цього агротехнічного заходу спостерігалось при використанні усіх досліджуваних штамів та транспозонових мутантів ризобій.

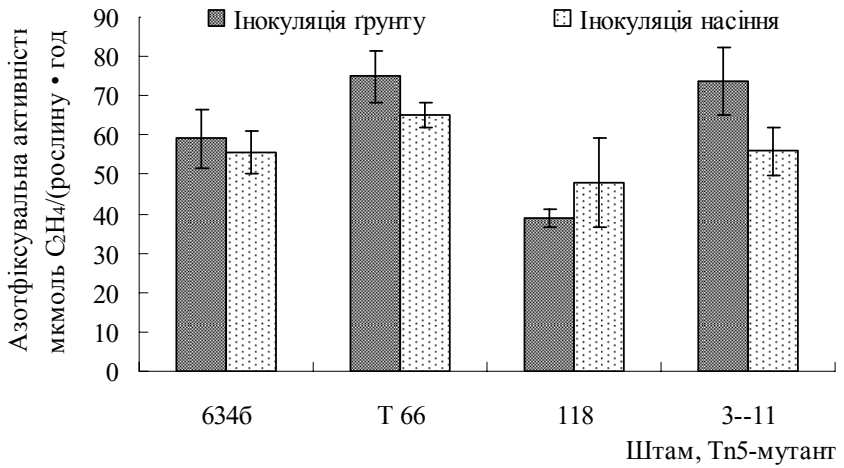


Рис 1. Загальна азотфіксувальна активність бульбочок сої на 2-й рік після виробничої інокуляції ризобіями, мкмоль C₂H₄/(рослину · год), середнє за три відбори

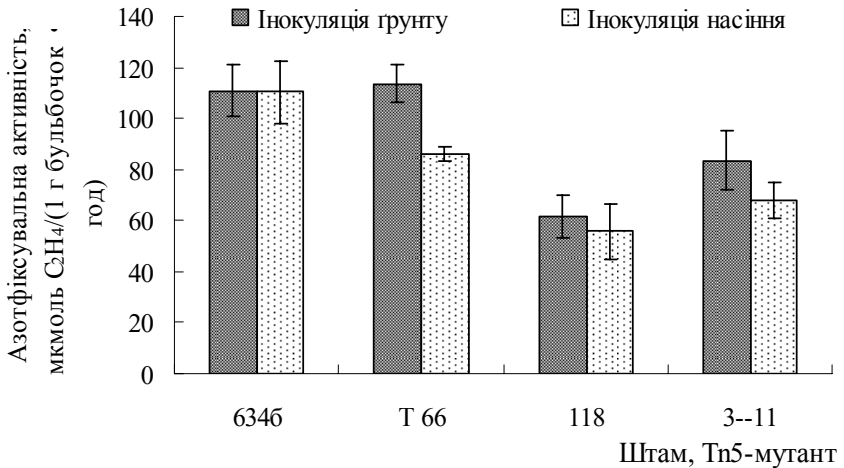


Рис 2. Питома азотфіксувальна активність бульбочок сої на 2-й рік після виробничої інокуляції ризобіями, мкмоль C₂H₄/(1 г бульбочок · год), середнє за три відбори

Таблиця 3. Вплив різних способів інокуляції сої окремими формами ризобій на урожайність культури

Інокулянт	Спосіб інокуляції	Виробнича інокуляція, 2007 р.			Спонтанна інокуляція, 2008 р.		
		Урожайність, ц/га	Приріст до штаму-стандарту за відповідного способу інокуляції		Урожайність, ц/га	Приріст до штаму-стандарту за відповідного способу інокуляції	
			ц/га	%		ц/га	%
Штам 6346	грунт	26,0	–	–	24,2	–	–
	насіння	24,3	–	–	23,8	–	–
Тп5-мутант Т66	грунт	31,3	5,3	20,4	28,0	3,8	15,7
	насіння	27,3	3,0	12,3	26,7	2,9	12,2
Тп5-мутант 118	грунт	24,0	-2,0	-7,7	24,3	0,1	0,4
	насіння	21,2	-2,8	-12,8	19,7	-4,1	-17,3
Тп5-мутант 3-11	грунт	32,3	6,3	24,2	27,5	3,3	16,6
	насіння	30,0	5,7	23,5	25,8	2,0	8,4
НІР ₀₅		2,5			2,6		

Отже, випробування двох способів інокуляції сої бульбочковими бактеріями – бактеризації насіння і внесення в ґрунт адекватної кількості бактеріальної суспензії під передпосівну культивування показало переваги останнього з названих способів. Сказане стверджується більшою кількістю утворених кореневих бульбочок, інтенсивнішою фіксацією молекулярного азоту атмосфери і формуванням більшого врожаю зерна даної культури. При вирощуванні сої на полях, де вона висівалась у попередньому році із застосуванням інокуляції активними штамами ризобій, симбіотичні властивості цих мікроорганізмів – вірулентність і азотфіксувальна активність – зберігаються і в наступному році. Польові випробування ефективності трьох перспективних транспозонових мутантів *B. japonicum* 646 свідчать про переваги двох із них (Т66 і 3-11) над штамом-стандартом 6346.

1. Базилинская М.В. Использование биологического азота в земледелии /М.В. Базилинская. – М. : ВНИИГЕНС, 1985. – 15 с.

2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта /Б.А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

3. Кожемяков А.П. Роль нитрагинизации в повышении урожая и накоплении белка бобовыми культурами /Кожемяков А.П., Доросинский Л.М. //Труды ВНИИСХМ. – 1987. – С. 7-15.
4. Tn5-мутанти *Bradyrhizobium japonicum* – отримання та вивчення їхніх властивостей /Коць С.Я., Маліченко С.М., Даценко В.К. [та ін.] //Фактори експериментальної еволюції організмів. – Т. 7. – К.: Логос, 2009. – С. 28-32.
5. Маліченко С.М. Ефективність симбіотичних систем, утворених за участю сої і транспозантів бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* 646 /Маліченко С.М., Даценко В.К., Василюк В.М. //Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. Біологія. – 2006. – Вип. 18. – С. 144-148.
6. Транспозоновий мутагенез штамів *Bradyrhizobium japonicum* /Маліченко С.М., Даценко В.К., Василюк В.М., Коць С.Я. //Физиол. и биохим. культ. раст. – 2007. – Т. 39, № 5. – С. 409-418.
7. Маркова А. Вертикална миграция на шамове *Bradyrhizobium japonicum* в карбонатен чернозем /Маркова А., Чанова Д. //Почвозн. агрохим. и екол. – 2002. – Т. 37, № 4. – С. 35-36.
8. Мікроорганізми і альтернативне землеробство /[Патика В.П., Тихонович І.А., Філіп'єв І.Д. та ін.]. – К.: Урожай, 1993. – 175 с.
9. Препараты клубеньковых бактерий для повышения урожайности бобовых культур /Патыка В.Ф., Толкачев Н.З., Шерстобоева Е.В. [и др.] //Україна в світових земельних, продовольчих і кормових ресурсах і економічних відносинах : тези доп. міжнар. конф. (Вінниця, грудень 1995). – С. 313-314.
10. Самошкина В.И. Влияние инокуляции и азота минеральных удобрений на фиксацию соей молекулярного азота /Самошкина В.И., Толкачев Н.З. //Биологическая фиксация молекулярного азота. – К.: Наук. думка, 1983. – С. 74-76.
11. The acetylene–ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation /Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. //Plant Physiol. – 1968. – Vol. 43, № 8. – P. 1185-1207.
12. Lindstrom K. Stability of markers used for identification of two *Rhizobium galegae* inoculant strains after five years in the field /Lindstrom K., Lipsanen P., Kaijalainen S. //Appl. and Environ. Microbiol. – 1990. – Vol. 56, № 2. – P. 444-450.
13. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment /Sullivan Y.T., Patrick H.N., Lowther W.L. [et al.] //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – № 92. – P. 8985-8989.
14. Young P.W. Molecular population genetic and evolution of rhizobia /Young P.W. //The nitrogen fixation and its research in China /ed. by Hong G. F. – Berlin; Heidelberg: Springer – Verlag, 1992. – P. 366-381.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ИНОКУЛЯЦИИ СОИ КЛУБЕНЬКОВЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Маличенко С.М., Даценко В.К., Маменко П.Н., Коць С.Я.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев

*Исследована эффективность предпосевной инокуляции сои клубеньковыми бактериями при непосредственной бактеризации посевного материала и при внесении инокулята в почву под предпосевную культивацию, а также способность ризобий, оставшихся в почве, вступить в следующем году в эффективный симбиоз с соей. В работе использованы жидкие бактериальные культуры производственного штамма *Bradyrhizobium japonicum* 634b и трех перспективных Tn5-мутантов *B. japonicum* 646. Внесение в почву бактериальных суспензий оказалось более эффективным в оба года исследований, по сравнению с инокуляцией семян, о чем свидетельствует более высокая нитрогеназная активность корневых клубеньков и урожайность зерна сои. Из трех исследуемых транспозоновых мутантов два оказались более эффективными по сравнению со штаммом-стандартом.*

Ключевые слова: инокуляция, клубеньковые бактерии, соя, Tn5-мутанты, эффективность симбиоза.

THE EFFICIENCY OF DIFFERENT MEANS OF SOY-BEAN INOCULATION WITH NODULE BACTERIA

Malichenko S.M., Datsenko V.K., Mamenko P.M., Kots S.Ya.

Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv

*The efficiency of the presowing soybean inoculation with nodule bacteria at direct seeds bacterization or introduction of inoculum to the soil at presowing cultivation as well as the ability of rhizobia remained in the soil to the next year to form active symbioses with soybean plants was studied. The liquid bacterial cultures of production strain *Bradyrhizobium japonicum* 634b and three perspective Tn5-mutants of *B. japonicum* 646 were used. The introduction of the inoculum to soil was shown to be more efficient during both years of investigations as compared with the seeds inoculation which resulted in higher number of nodules formed, their nitrogenase activity and greater soybean seeds yield. Two of three studied Tn5-mutants had surpassed the standard strain by the efficiency indices.*

Key words: inoculation, nodule bacteria, soybean, Tn5-mutants, efficiency of symbioses.