



# Землеробство, грунтознавство, агрохімія

УДК 635.652.2:631.847.211:

633.34

© 2017

*Д. В. Крутило,*

*кандидат  
біологічних наук*

*Інститут  
сільськогосподарської  
мікробіології та  
агропромислового  
виробництва НААН*

## **ЕФЕКТИВНІСТЬ СПІЛЬНОЇ ІНОКУЛЯЦІЇ СОЇ ШТАМАМИ BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM З РІЗНОЮ ШВИДКІСТЮ РОСТУ**

**Мета.** Вивчити ефективність поєданого застосування штамів *Bradyrhizobium japonicum* з повільним та інтенсивним ростом за вирощування сої. **Методи.** Мікробіологічні, польові та статистичні. **Результати.** Досліджено можливість використання штамів бульбочкових бактерій сої з різною швидкістю росту для підвищення врожайності рослини-господаря. Установлено, що поєдане застосування 2-х активних штамів *B. japonicum* переважає за ефективністю моноінокуляцію. У бінарних композиціях ризобії з повільним та інтенсивним ростом підсилюють дію один одного і сприяють утворенню збалансованих симбіотичних систем без різкого домінування окремих штамів у бульбочкових популяціях. **Висновки.** Запропоновано композицію штамів *B. japonicum* 46 та *B. japonicum* KB11, яка забезпечує стабільне збільшення врожайності сої на 21,4–30,0% порівняно з контролем без інокуляції.

**Ключові слова:** *Bradyrhizobium japonicum*, бінарна композиція штамів, соя, ризогумін.

Біологічна фіксація молекулярного азоту атмосфери є одним з основних джерел азоту в агроценозах. Важливу роль у цьому процесі відіграють симбіотичні мікроорганізми — бульбочкові бактерії, які ініціюють утворення азотфіксуючих бульбочок на коренях бобових рослин [1–3]. Завдяки здатності до фіксації азоту бульбочкові бактерії розглядають як цінний генетичний ресурс для біотехнології сільського господарства [4–6]. Масштаби щорічного виробництва мікробних препаратів для інокуляції бобових культур дають змогу обробляти

сотні мільйонів гектарів посівів [4, 6].

У ґрунтах України за роки вирощування сої із застосуванням біопрепаратів сформувалися і функціонують різні за щільністю популяції бульбочкових бактерій сої. Згідно з попередніми дослідженнями, у цих популяціях трапляються штами, які характеризуються повільним та інтенсивним ростом. Вивчення їх біологічних властивостей показало, що штами ризобій сої з різною швидкістю росту мають істотні відмінності за фенотиповими та генотиповими ознаками [4]. Установлено, що штами з інтенсивним ростом активно

колонізують корені рослин і краще приживаються в ґрунті, ніж штами з повільним ростом, тобто їм властива підвищена сапрофітна компетентність [7]. Ця особливість досліджуваних штамів бульбочкових бактерій може бути використана на практиці під час створення нових мікробних препаратів із широким спектром корисної дії. Поєднане застосування для інокуляції насіння сої кількох вискоелективних штамів ризобій із різною стратегією виживання в ґрунті сприятиме не лише підвищенню врожайності культури, а й формуванню стабільної активної популяції специфічних мікроорганізмів.

**Мета досліджень** — вивчити ефективність спільного застосування штамів *Bradyrhizobium japonicum* із повільним та інтенсивним ростом за вирощування сої.

**Матеріали і методи досліджень.** Об'єктами досліджень були штами бульбочкових бактерій сої з повільним (*B. japonicum* 46, *B. japonicum* M8, *B. japonicum* 6346) та інтенсивним (*B. japonicum* KB11) ростом і соя сортів Устя та КиВін.

Польові досліді з вивчення ефективності поєданого застосування штамів *Bradyrhizobium japonicum* проводили в умовах Полісся (Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН (ІСМАВ), м. Чернігів) на чорноземі вилугуваному (рН — 6,0; уміст гумусу — 3,5%; легкогидролізованого азоту (за Корнфільдом) — 95 мг;

рухомих форм фосфору ( $P_2O_5$ ) — 251 мг та обмінного калію ( $K_2O$ ) (за Кирсановим) — 108 мг на 1 кг). Насіння сої сорту Устя обробляли штамми *B. japonicum* з повільним та інтенсивним ростом. За спільної інокуляції 2-ма штамми їх застосовували в співвідношенні 1:1. Інокуляційне навантаження в усіх варіантах досліді становило 200–300 тис. клітин на 1 насінину. Повторність — 4-разова. Площа облікової ділянки — 6 м<sup>2</sup>. Розміщення ділянок — рендомізоване.

Упродовж вегетаційного періоду визначали кількість та масу кореневих бульбочок. Активність симбіотичної азотфіксації вимірювали ацетилен-етиленовим методом [8] на газовому хроматографі «Chrom-4». Ідентифікацію ризобій, які інфікували рослини, проводили в реакції аглютинації із застосуванням специфічних антисироваток та гомогенатів бульбочок [6]. Уміст фотосинтетичних пігментів у листках рослин визначали у фазі цвітіння спектрофотометричним методом [9].

Виробничий досліді проводили в умовах Центрального Лісостепу (дослідіне господарство «Бохоницьке» Інституту кормів та сільськогосподарства Поділля НААН (ІСМАВ), м. Вінниця) на сірому лісовому середньосуглинковому ґрунті (рН — 4,9–5,3; уміст гумусу (за Тюрнімом) — 1,8–2,1%; легкогидролізованого азоту (за Корнфільдом) — 72–90 мг;  $P_2O_5$  — 100–120 мг і  $K_2O$  (за Чиріковим) — 130–140 мг на 1 кг). У ґрунті поширена

**1. Вплив спільної інокуляції штамми ризобій з повільним та інтенсивним ростом на симбіотичні показники сої сорту Устя (польовий досліді, ІСМАВ НААН, 2014 р.)**

Варіант досліді	Кількість бульбочок, од./рослину			Маса бульбочок, г/рослину		
	Фаза росту					
	Стеблуння	Цвітіння	Налив бобів	Стеблуння	Цвітіння	Налив бобів
Без інокуляції (контроль)	0,58	1,33	3,08	0,06	0,10	0,18
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 46	5,25	11,17	20,67	0,15	0,32	1,04
Інокуляція <i>B. japonicum</i> M8	7,33	13,33	20,75	0,16	0,31	0,98
Інокуляція <i>B. japonicum</i> KB11	6,08	10,08	17,00	0,15	0,29	1,02
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 46+ <i>B. japonicum</i> KB11	10,92	19,75	24,58	0,23	0,41	1,21
Інокуляція <i>B. japonicum</i> M8+ <i>B. japonicum</i> KB11	11,92	16,08	25,67	0,24	0,39	1,16
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 6346+ <i>B. japonicum</i> KB11	8,42	10,92	21,00	0,19	0,36	1,23
НІР <sub>05</sub>	1,85	3,16	3,83	0,03	0,05	0,13

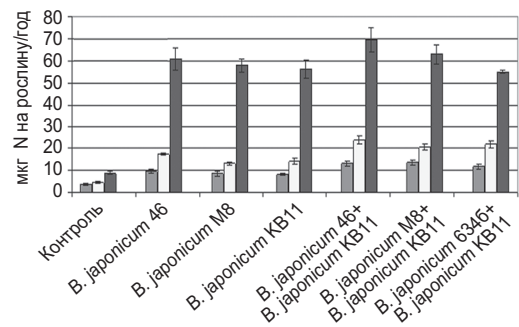
місцева популяція бульбочкових бактерій сої з високою щільністю. Вирощували сою сорту КиВін. Насіння обробляли біопрепаратом комплексної дії ризогуміном на основі бінарної композиції штамів *B. japonicum* 46+*B. japonicum* KB11 із розрахунку 200 г/га. Площа виробничої перевірки становила 25 га.

Обробку експериментальних даних проводили за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Office Excel і Statistica 7.0.

**Результати досліджень.** У польовому досліді із соєю вивчали конкурентоспроможність і ефективність штамів *B. japonicum* з повільним та інтенсивним ростом за їх поєданого використання в різних комбінаціях.

За даними табл. 1, на коренях рослин контрольного варіанта (без інокуляції) утворювалися поодинокі бульбочки. Їх кількість була незначною (0,6–3,1 од./рослину) упродовж усієї вегетації сої, що свідчить про наявність у ґрунті нечисленної популяції специфічних бульбочкових бактерій (щільність популяції –  $10^1$ – $10^2$  клітин у 1 г ґрунту). Серологічний аналіз гомогенатів бульбочок показав, що бактерії, які інфікували рослини, належать до 3-х серологічних груп: KB11 (штами з інтенсивним ростом), 46 та M8 (штами з повільним ростом) у співвідношенні 64,6 %, 25,0 і 10,4 % відповідно (табл. 2).

Попри наявність у ґрунті гетерогенної популяції ризобій сої застосування всіх досліджуваних штамів (*B. japonicum* 46, *B. japonicum* M8 та *B. japonicum* KB11) сприяло істотному збільшенню кількості бульбочок у 5,5–12,6 раза порівняно з контролем (див. табл. 1). За спільної інокуляції сої штамми з різною швидкістю росту цей



**Активність симбіотичної азотфіксації за інокуляції сої штамми бульбочкових бактерій із різною швидкістю росту (польовий дослід, ІСМАВ НААН, 2014 р.):** □ — стеблукання; □ — цвітіння; ■ — наливе бобів

показник достовірно перевищував моноінокуляцію (у 1,1–2,1 раза). Максимальна кількість бульбочок спостерігалася у варіантах із застосуванням 2-х комбінацій з повільним та інтенсивним ростом штамів – *B. japonicum* 46+*B. japonicum* KB11 та *B. japonicum* M8+*B. japonicum* KB11.

Зі збільшенням кількості бульбочок за поєданого застосування штамів *B. japonicum* достовірно збільшувалася і їх маса. Максимальні значення цього показника відзначено у фазі наливу бобів — 1,16–1,23 г на 1 рослину.

Результати серологічного аналізу засвідчили, що інокуляція істотно змінювала співвідношення штамів у бульбочках (табл. 2). Так, за моноінокуляції сої досліджуваними штамми *B. japonicum* KB11, *B. japonicum* 46 та *B. japonicum* M8 вони повністю домінували в бульбочках (100,0%), витісняючи місцеві

**2. Конкурентоспроможність бульбочкових бактерій сої з повільним та інтенсивним ростом (польовий дослід, ІСМАВ НААН, 2014 р.)**

Варіант досліджу	Частка штамів у бульбочках, %			
	KB11	46	M8	6346
Без інокуляції (контроль)	64,6	25,0	10,4	0
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 46	0	100,0	0	0
Інокуляція <i>B. japonicum</i> M8	0	0	100,0	0
Інокуляція <i>B. japonicum</i> KB11	100,0	0	0	0
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 46+ <i>B. japonicum</i> KB11	37,5	45,8	16,7	0
Інокуляція <i>B. japonicum</i> M8+ <i>B. japonicum</i> KB11	45,8	12,5	41,7	0
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 6346+ <i>B. japonicum</i> KB11	35,4	8,3	0	56,3

**3. Вплив спільної інокуляції штамми ризобій з повільним та інтенсивним ростом на насіннєву продуктивність сої сорту Устя (польові дослід, ІСМАВ НААН, 2012–2014 рр.)**

Варіант досліду	Урожайність, т/га					Приріст урожаю, %	
	2012	2013	2014	Середнє	Середнє за моно- та спільної інокуляції		
Без інокуляції (контроль)	2,55	2,23	2,39	2,39	2,39	–	–
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 46	2,96	2,61	2,83	2,80	2,76	+17,2	15,4
Інокуляція <i>B. japonicum</i> M8	2,88	2,53	2,70	2,70		+13,0	
Інокуляція <i>B. japonicum</i> KB11	2,88	2,55	2,88	2,77		+15,9	
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 46+ <i>B. japonicum</i> KB11	3,10	2,90	3,05	3,02	2,91	+26,4	21,8
Інокуляція <i>B. japonicum</i> M8+ <i>B. japonicum</i> KB11	3,04	2,72	3,01	2,92		+22,2	
Інокуляція <i>B. japonicum</i> 6346+ <i>B. japonicum</i> KB11	2,97	2,64	2,75	2,79		+16,7	
НІР <sub>05</sub>	0,12	0,18	0,19				

ризобії, що є доказом їх високої конкурентоспроможності.

Слід зазначити, що за інокуляції сої 2-ма штамми не спостерігалось повного домінування інтродукованих штамів. Їх частка в бульбочках коливалася в межах 38–46%. Крім того, у зазначених варіантах місцеві ризобії також займали свою екологічну нішу й утворювали 13–17% бульбочок.

На рисунку показано нітрогеназну активність бульбочок за обробки сої штамми з різною швидкістю росту. За наведеними даними у варіантах з інокуляцією досліджуваними бульбочковими бактеріями активність симбіотичної азотфіксації була значно вищою (у 2,2–7,9 раза), ніж у контролі. Як зазначалося вище, за поєднаного використання штамів *B. japonicum* маса кореневих бульбочок була найбільшою. У цих самих варіантах найактивніше відбувалася й фіксація молекулярного азоту. У всі фази розвитку рослин максимальні показники азотфіксувальної активності (13,05–69,53 мкг N на 1 рослину/год) відзначено за інокуляції сої 2-ма штамми *B. japonicum* 46 + *B. japonicum* KB11.

Про позитивний вплив штамів бульбочкових бактерій на фізіологічний стан рослин сої свідчить істотне збільшення вмісту хлорофілів а і b у листках. Так, у варіантах з інокуляцією окремими штамми *B. japonicum* сума хлорофілів а і b була на 18–25%

більшою, ніж на контролі. За поєднаного використання штамів в усіх досліджуваних комбінаціях уміст фотосинтетичних пігментів у листках сої збільшувався щодо контролю на 36–40%.

Активізація симбіотичних систем сої за інокуляції штамми ризобій із різною швидкістю росту сприяла збільшенню врожайності культури на 13,0–20,5% порівняно з контролем (табл. 3). За поєднаного використання штамів *B. japonicum* вони підсилювали дію один одного, приріст урожаю насіння сої досягав 16,7–27,6%.

Узагальнені результати багаторічних польових дослідів свідчать про стабільність дії композицій штамів *B. japonicum* із різною швидкістю росту. У середньому за 3 роки найвищу врожайність сої було отримано за поєднаного використання штамів *B. japonicum* 46 та *B. japonicum* KB11 — 3,02 т/га проти 2,39 т/га на контролі без інокуляції.

Аналізуючи результати серологічного дослідження бульбочок упродовж 3-х років і врожайності, слід зазначити, що домінування в бульбочкових популяціях окремих активних штамів із різною швидкістю росту не має принципового значення для формування та функціонування ефективного симбіозу. Важливішим, на нашу думку, є утворення збалансованої симбіотичної системи сої з кількома комплементарними, хоча і серологічно

**4. Ефективність ризогуміну на основі бінарної композиції штамів *B. japonicum* за вирощування сої сорту КиВін (виробничий дослід ІКСГП НААН 2014 р.)**

Варіант досліджу	Урожайність, т/га	Приріст до контролю, %
Без інокуляції (контроль)	2,01	—
Ризогумін ( <i>B. japonicum</i> 46+ <i>B. japonicum</i> KB11)	2,44	21,4

відмінними штамми ризобій одного виду.

Бінарну композицію штамів *B. japonicum* 46 + *B. japonicum* KB11 як основу мікробного препарату ризогуміну перевіряли у виробничому досліді в ґрунтово-кліматичних умовах Центрального Лісостепу.

Установлено, що за наявності в ґрунті щільної місцевої популяції специфічних бульбочкових бактерій досліджуваний біопрепарат

забезпечував істотне підвищення врожайності сої сорту КиВін на 21,4% порівняно з контролем без інокуляції (табл. 4).

Бінарну композицію штамів *Bradyrhizobium japonicum* із різною швидкістю росту захищено патентом України і рекомендовано застосовувати для підвищення врожайності сої та створення в ґрунті активної популяції специфічних бульбочкових бактерій [10].

**Висновки**

Установлено, що поєднане застосування 2-х активних штамів *B. japonicum* із різною швидкістю росту переважає за ефективністю моноінокуляцію. У бінарних композиціях ризобії з повільним та інтенсивним ростом підсилюють дію один одного і сприяють утворенню збалансованих симбіотичних систем без різкого домінування окремих штамів у бульбочкових популяціях.

У середньому за 3 роки найвищу врожайність сої отримано за поєданого використання штамів *B. japonicum* 46 та *B. japonicum* KB11 — 3,02 т/га проти 2,39 т/га на контролі без інокуляції. Обробка насіння сої біопрепаратом ризогуміном на основі цієї композиції штамів забезпечила підвищення врожайності культури на 21,4% порівняно з контролем без інокуляції.

**Бібліографія**

1. *Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями; под ред. Г. Спайнка, А. Кондорози, П. Хукаса; пер. с англ. СПб.: Бионт, 2002. — 558 с.  
 2. Zahran H.H. Rhizobia from wild legum: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology/ H.H. Zahran//J. Biotechnol. — 2001. — V. 91, № 2–3. — P. 143–153.  
 3. Giles E.D.O. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in Legumes/E.D.O. Giles, J.A. Downie//Annu. Rev. Plant Biol. — 2008. — V. 59. — P. 519–546.  
 4. *Биорегуляция* микробно-растительных систем: моногр./Г.А. Иутинская, С.П. Пономаренко, Е.И. Андреюк и др.; под ред. Г.А. Иутинской, С.П. Пономаренко. — К.: Ничлава, 2010. — 464 с.  
 5. *Биологическая* фиксация азота: бобово-ризобиальный симбиоз/С.Я. Коць, В.В. Моргун, В.Ф. Плятка и др. — К.: Logos, 2011. — Т. 2. — 523 с.  
 6. *Симбиогенетика* и селекция макросимбионта на повышение азотфиксации на примере гороха

(*Pisum Sativum* L.)/К.К. Сидорова, В.К. Шумный, Е.Ю. Власова и др.//Вестн. ВОГиС. — 2010. — Т. 14, № 2. — С. 357–374.  
 7. Krutylo D.V. Genotypic analysis of nodule bacteria nodulating soybean in soils of Ukraine/D.V. Krutylo, V.S. Zotov//Russian Journal of Genetics: Applied Research. — 2015. — V. 5, Iss. 2. — P. 102–109.  
 8. *The acetylene-ethylene assay* for N<sub>2</sub>-fixation: Laboratory and field evaluation/R.W.F. Hardy, R.D. Holsten, E.K. Jackson et al.//Plant Physiol. — 1968. — V. 43, № 8. — P. 1185–1207.  
 9. *Гродзинский А.М.* Краткий справочник по физиологии растений/А.М. Гродзинский, Д.М. Гродзинский. — К.: Наукова думка, 1973. — 398 с.  
 10. *Пат. 111340 Україна*, МПК С12N 1/20, С05F 11/08. Бінарна композиція штамів *Bradyrhizobium japonicum* з різною швидкістю росту для підвищення продуктивності сої/Крутило Д.В.; заявник та патентовласник Ін-т с.-г. мікробіол. та агропром. виробн. НААН. — № u 2016 04110; заявл. 15.04.16; опубл. 10.11.16, Бюл. № 21. — 6 с.

Надійшла 5.07.2017.