

УДК 633.31/37 : 631.461.5

М. З. Толкачов, кандидат біологічних наук

І. О. Каменєва, кандидат сільськогосподарських наук

С. В. Дідович

*Південний філіал Інституту сільськогосподарської мікробіології
УААН*

СЕЛЕКЦІЯ ЕФЕКТИВНИХ ШТАМІВ *MESORHIZOBIUM CICERI* ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ РИЗОБОФІТУ ПІД НУТ (*CICER ARIETINUM*)

*Виділено 68 штамів *Mesorhizobium ciceri* та встановлена ефективність їх симбіозу з сучасними сортами нуту в умовах вегетаційних дослідів. Високоєфективні штами Н-12, ПН-12, Н-18, 068, НС-6 підвищували урожай зеленої маси нуту на 6-30% у порівнянні з еталонними штамами. Вивчені їх культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості. Технологічний штам Н-12 рекомендовано для виготовлення ризобофіту під нут.*

Ключові слова: *штам, нут, сорт, селекція, ефективність, симбіотична азотфіксація, препаративна форма.*

Нут – одна з давніх і відомих культур світового землеробства, яка за площею посівів займає третє місце серед зернобобових рослин. На Україні він має великі перспективи у виробництві рослинного білка і відновленні родючості ґрунту в суходольному землеробстві, особливо за умов значного скорочення площі зрошуваних земель.

У технології вирощування нуту передбачена нітрагінізація – передпосівна обробка насіння біопрепаратами ефективних селекційних штамів *Mesorhizobium ciceri*, яка забезпечує підвищення інтенсивності симбіотичної азотфіксації і продуктивності рослин [1]. Рослини нуту вступають у симбіоз з бульбочковими бактеріями виду *M. ciceri*, утворюють азотфіксуючі бульбочки і здатні в умовах півдня України засвоїти за вегетацію до

80-150 кг/га молекулярного азоту та сформувати без застосування азотних добрив урожай зерна 20-25 ц/га [2]. В ґрунтах України немає аборигенних бульбочкових бактерій нуту і лише в окремих місцях, де раніше вирощували цю культуру, зустрічаються локальні інтродуковані популяції *M. ciceri*, які можуть бути джерелом нових штамів бульбочкових бактерій нуту, адаптованих до місцевих ґрунтово-кліматичних умов. В Україні селекція бульбочкових бактерій нуту ведеться тільки у Південному філіалі ІСГМ УААН протягом останніх 20 років. Метою наших досліджень було виділити нові штами *M. ciceri*, встановити ефективність їх симбіозу з сучасними сортами нуту, вивчити культурально-морфологічні, фізіолого-біохімічні та технологічні властивості штамів, котрі суттєво перевищували за симбіотичними показниками еталонні, для виготовлення біопрепаратів на їх основі.

Матеріали і методика досліджень. Нові штами *M. ciceri* виділяли методом аналітичної селекції [3]. Культуральні та фізіолого-біохімічні особливості перспективних штамів ризобій нуту вивчали згідно методичних рекомендацій Всеросійського НДІСГМ РАСГН [4], загальноприйнятих методів ґрунтової мікробіології і біохімії [5], експериментальної медичної бактеріології [6]. Ідентифікацію бульбочкових бактерій нуту проводили за визначником Бержі [7] і згідно сучасної систематики як вид бактерій, нодулюючих нут [8].

Ефективність симбіотичної азотфіксації штамів *M. ciceri* з рослинами оцінювали у вегетаційних дослідах у порівнянні з виробничими штамми 520, 522, 527, отриманими з міжнародної колекції ВНДІСГМ РАСГН [8]. Рослини нуту вирощували у весняній теплиці Південного філіалу ІСГМ УААН на простерилізованому безазотному субстраті – спученому вермікуліті (слюдяна крихта фракції 2-5 мм) з модифікованим середовищем Красильнікова-Кореняко у посудинах на 500 мл з перфорованим дном. Нут вирощували до фази цвітіння по 2 рослини у посудині, повторність семиразова.

Насіння перед висівом обробляли суспензією 7-добової культури ризобій із розрахунку 10^6 бактерій/насінину. Нітрогеназну активність бульбочок визначали ацетиленовим методом з використанням газової хроматографії за допомогою полум'яно-іонізаційного детектора на газовому хроматографі «*Chrom-5*» [10, 11]. Титр бульбочкових бактерій нуту аналізували методом граничних розведень з висівом на агарізоване бобове середовище з сахарозою. Вермікулітний біопрепарат виготовляли за технологією ризобіофіту для сої (ТУ У 319.00494456-006-2002). Гетерофазні препарати виготовлено з внесенням в рідке середовище для культивування повільно-

ростучих бульбочкових бактерій (ПББ) 2% лігніну (фракція пилу), вермикуліту (фракція пилу) та активного мулу [12]. Статистичну обробку отриманих даних проводили методом дисперсійного аналізу [13].

Результати досліджень. Для виділення високоефективних штамів бульбочкових бактерій нуту, пристосованих до сортів, що вирощують в ґрунтово-кліматичних умовах зони Степу, були використані кореневі бульбочки нуту та зразки ґрунту з насінєвих посівів СГІ, Луганського Інституту АПВ УААН і Саратовської дослідної станції (Росія). За період досліджень (1987-2003 рр.) було виділено 68 високоефективних штамів ризобій нуту, які підпримуються періодичними пересівами на агаризованному бобовому середовищі. Всі виділені штами формували азотфіксуючі бульбочки у симбіозі з сучасними сортами нуту Смачний, Колорит, Добриня, Луганець, Розана, Олександрит, Пам'ять, Карпово, Буджак, Антей, Тріумф.

У 2005 році вивчена ефективність симбіозу нового крупнозерного сорту Тріумф з 3-ма еталонними та 19-ма перспективними штамми *M. ciceri* (табл. 1).

У досліді було використано нестерильне насіння нуту. Бульбочкові бактерії епіфітної мікрофлори насіння нуту утворили значну кількість бульбочок в контролі, але інокуляція селекційними штамми підвищила їх чисельність у 2,1-3,2, біомасу – у 1,1-1,5, а нітрогеназну активність – у 1,7-16,3 рази.

Серед еталонних штамів за комплексом показників симбіотичної ефективності кращими були штами 522 і 527. Усі перспективні штами показали високу ефективність симбіозу з нутом сорту Тріумф на рівні еталонних штамів, а нові штами Н-14, Н-17 і Н-18 переважали штам 527 за урожаєм зеленої маси рослин нуту на 20-30% і виявились найбільш генетично компліментарними сорту Тріумф.

На основі проведених досліджень були відібрані кращі штами *M. ciceri* Н-12, Н-14, Н-17, Н-18, НС-6 для вивчення їх культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостей у порівнянні з еталонним штамом 527. Показано, що у зрілій 5-7-добовій культурі – це рухливі клітини у формі паличок розміром 2,0-2,2 x 0,5-0,6 мкм зі джгутиками. Бульбочкові бактерії нуту грамнегативні, спор не утворюють, облигатні аероби.

Зростання бактерій при посіві штрихом на агаризованому гороховому середовищі з сахарозою рясне, слабо-білуватого кольору, плоске, слизувате, стікаюче. Колонії клітин на агаризованих середовищах (нутовому, бобовому, манітно-дріжджовому) однотипні, круглі з рівним чітким контуром, блискучі, білувато-прозорі, опухлі, слизуваті, до 1,0-1,5 мм у діа-

метрі, з'являються на п'яту добу та пізніше, що характерно для повільно-ростучих бульбочкових бактерій. Ризобії нуту добре використовують за джерело вуглецю середовища з моносахаридами (глюкоза, арабіноза, ксилоза, рамноза), дисахаридами (сахароза, лактоза, мальтоза, харчовий цукор) та цукровими спиртами (сорбіт, маніт) і підкислюють його. Середовища з трисахаридом рафінозою, цукровим шестиатомним спиртом дульцитом підлжують. Штами не використовують в якості єдиного джерела вуглецю геміцелюлозу, крохмаль, органічні кислоти.

1. Ефективність симбіозу штамів *Mesorhizobium ciceri* з нутом сорту Тріумф

Варіант дослідю	Кількість бульбочок/ рослину	Біомаса бульбочок, мг/ рослину	Нітрогеназна активність, наноМолей C_2H_4 /рослину за годину	Зелена маса нуту, г/рослину
Контроль	25	400	270	4,1
Штами еталонні: 520	55	440	4027	3,7
522	79	580	2925	4,6
527	74	570	1596	5,0
Перспективні: Н-12	80	480	1311	5,0
ПН-12	77	550	969	4,8
НС-6	63	450	1159	5,1
Н-14	67	520	1520	6,5
Н-17	57	420	1406	6,0
Н-18	57	540	2013	6,5
Н-22	53	440	456	5,1
Н-24	70	560	1406	4,6
Н-27	50	490	2773	4,9
Н-28	65	490	1083	4,5
039	77	580	456	4,6
044	71	520	4179	5,1
050	63	500	2773	5,3
051	80	580	2925	5,0
063	72	550	4406	5,0
065	81	500	2754	4,6
068	68	530	1577	5,0
075	57	530	3001	5,2
077	52	480	2621	4,6
НІР ₀₅	12	90	201	0,6

За джерело азоту ризобії нуту використовують азот мінеральних солей – амонійний, нітратний, а також амідний азот. На середовищах з органічними джерелами азоту (гороховому, нутовому та капустианому агарі) інтенсивно накопичують полісахаридний слиз. На МПА та ГПА (гліцери-

но-пептонному агарі) відмічено помірний ріст та збереження слизу і блиску до одного місяця, але ще через місяць полісахаридний слиз висихає, залишаючи чіткий штрих посіву. Досліджувані штами *M. ciceri* синтезують фермент нітратредуктазу, відновлюючи нітрати до аміаку, а також виявляють уреазну активність. Штами мають слабку протеолітичну активність, вони не розріджують желатин, дуже помірно ростуть на МПА. Нові штами *M. ciceri* добре розвиваються на картопляній скибочці, викликаючи легке побуріння та утворюють слизистий наліт білувато-жовтуватого кольору.

Температурний інтервал росту штамів на щільних і в рідких середовищах складає 20-37°C, а температурний оптимум – 26-30°C. Зростання бактерій спостерігається в діапазоні рН 4,5-8,5, оптимальною для розвитку клітин штамів є близька до нейтральної реакція середовища рН 6,5-7,5.

Ознаки штамів стійкі. Вони не є патогенними. Культури зберігають на МДА або на гороховому агарі з сахарозою при температурі 4-5°C. Пересівають один раз у чотири – шість місяців. Морфолого-біохімічні характеристики нових виділених штамів *M. ciceri* були схожі між собою та співпадали з штамом-прототипом 527.

Високоєфективні штами Н-12, Н-18 були оцінені на технологічність в порівнянні із стандартним штамом *M. ciceri* 522. Мікроорганізми культивували в рекомендованих для вирощування ПББ живильних середовищах протягом трьох діб при обертах качалки 220 об./хв. та температурі 27°C. Наприкінці культивування визначали титр ризобій та рН культури. В реактиваційному середовищі титри штамів Н-12, Н-18 були нижчі за стандарт на 1,8 та 2,2 млрд. КУО/мл, а у виробничому – досліджувані штами виявилися більш технологічними, їх титри перевищували титр штаму 522 відповідно в 2,5 та 1,5 разу (табл. 2).

2. Технологічні властивості штамів *Mesorhizobium ciceri* в рідких стандартних середовищах (млрд. КУО в 1 мл)

Штам	Реактиваційне середовище			Виробниче середовище		
	рН		Титр, млрд. КУО/мл	рН		Титр, млрд. КУО/мл
	середовища	культури		середовища	культури	
522	6,9	4,5	7,5 ± 0,17	6,8	5,3	18,5 ± 0,03
Н-12	6,9	4,5	5,3 ± 0,65	6,8	5,4	44,5 ± 0,29
Н-18	6,9	4,5	5,7 ± 0,17	6,8	5,3	28,5 ± 0,29

При культивуванні штамів спостерігали підкислення середовища, що пояснюється утворенням органічних кислот у процесі метаболізму вуглеводів.

Було вивчено зберігання штаму *M. ciceri* Н-12 в різних препаративних формах, виготовлених за технологією ризобіофіту для сої. Гетерофазна препаративна форма – рідке середовище з внесенням 2% вермикулітного пилу. Титр ризобій нуту після двотижневого зберігання в такій препаративній формі знижувався у 14 разів і складав 3,7 млрд. КУО/мл, а при подальшому зберіганні клітини втрачали життєздатність.

У твердій та гетерофазній препаративних формах титр *M. ciceri* Н-12 також знижувався від вихідного, але зберігався на достатньому для нітрагінізації насіння рівні протягом двох місяців. Таким чином, встановлено можливість зберігання ризобій нуту з титром 4,5-7,5 млрд. КУО/г в досліджуваних препаративних формах протягом двох місяців.

За технологією ризобіофіту було виготовлено препарати бульбочкових бактерій нуту штаму Н-12 з торф'яним, лігніновим і вермикулітним наповнювачами та вивчено строки їх збереження (табл. 6).

3. Вживання *Mesorizobium ciceri* Н-12 у сипучих субстратах, млрд. КУО в 1 г препарату

Варіанти досліджу	Вихідний титр	1 місяць	2 місяці	3 місяці
Торф	5,4 ± 0,10	2,8 ± 0,10	2,5 ± 0,06	2,2 ± 0,00
Лігнін	7,2 ± 0,20	3,9 ± 0,10	3,1 ± 0,12	0,9 ± 0,00
Вермикуліт	6,3 ± 0,24	3,7 ± 0,20	2,0 ± 0,03	0,4 ± 0,00
Вермикуліт + 2% активного мулу	5,8 ± 0,03	3,1 ± 0,03	2,7 ± 0,00	0,3 ± 0,00

Результати дослідів показали, що термостерильний торф є найкращим субстратом для *M. ciceri* Н-12. Після тримісячного збереження титр клітин зменшувався в 2,5 разу від вихідного і складав 2,2 млрд. КУО/г. Лігніновий препарат мав вихідний титр 7,2 млрд. КУО/г та зберігав його протягом двох місяців на рівні 3,0 млрд. КУО/г. Внесення у вермикуліт 2% активного мулу істотно не впливало на розмноження та збереження ризобій нуту.

Висновки. 1. З бульбочок нуту у чисту культуру виділено 68 штамів, ідентифікованих за культурально-морфологічними та фізіолого-біохімічними ознаками як *M. ciceri*.

2. Встановлена ефективність їх симбіозу з сучасними сортами нуту. Високоєфективні і технологічні штами Н-12, Н-18 рекомендовано для виготовлення ризобіофіту під нут.

3. Показано, що оптимальне розмноження *M. ciceri* Н-12 проходить у гетерофазному препараті з добавкою 2% вермикуліту та сипучих препаратах на основі лігніну, вермикуліту і вермикуліту з добавкою 2% активного мулу.

4. Найдовше збереження необхідного для нітрагінізації насіння тютю *M. ciceri* Н-12 протягом трьох місяців встановлено у сипучому препараті з торф'яним наповнювачем, у інших препаративних формах термін зберігання не перевищував двох місяців.

Бібліографічний список

1. Толкачев Н.З., Шерстобоева Е.В., Мельничук Т.Н., Дидович С.В. и др. Биологическая технология выращивания нута / Инф. листок Крымского РЦНТЭИ. – Симферополь, 2002. – № 2. – 4 с.

2. Сичкарь В.И., Бушулян О.В., Толкачев Н.З. Нут. Биологические особенности, технология выращивания и новые сорта. – Одесса, 2004 – 18 с.

3. Методы исследований клубеньковых бактерий / Методические рекомендации для курсов повышения квалификации научных сотрудников по сельскохозяйственной микробиологии – Л. – 1981. – 48 с.

4. Методические рекомендации по идентификации неспорных бактерий, доминирующих в ризосфере растений – Л. – 1985. – 48 с.

5. Методы почвенной микробиологии и биохимии. Под ред. Д.Г.Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ. – 1991. – 303 с.

6. Тимаков В.Д., Гольдфарб Д.М. Основы экспериментальной медицинской бактериологии. – М.: Медгиз, 1958. – 347 с. 100-225.

7. Определитель бактерий Берджи. В 2-ух томах. Пер. с англ. /Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – Т.1.– М: Мир.– 1997. – 432 с.

8. Rhizobiaceae: Молекулярная биология взаимодействующих бактерий с растениями /Русский перевод под ред. Тихоновича И.А., Проворова Н.А., Санкт-Петербург: ООО «ИПК «Бионт», 2002. – 568 р.

9. Методы исследований клубеньковых бактерий / Методические рекомендации для курсов повышения квалификации научных сотрудников по сельскохозяйственной микробиологии – Л. – 1981. – 48 с.

10. Методические указания по использованию ацетиленового метода при селекции бобовых культур на повышение симбиотической азотфиксации. – Л. – 1982. – 12 с.

11. Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.G. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation laboratory and field evaluation // Plant. Physiol. – 1968. – 42, № 8. – P. 1185-1207.

12. Хотянович А.В. Методы культивирования азотфиксирующих бактерий и способы получения препаратов на их основе (Методические рекомендации) Л. – 1991. – 60 с.

13. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М: Агропромиздат. – 1985. – 351 с.