

Глазова, Виктор Иванович Мазалов, Надежда Олеговна Костикова.

Полная и быстрая реализация достижений селекции, сортомена и сортообновление невозможны без ускоренного размножения семян новых сортов, совершенствования системы семеноводства. Поэтому наряду с научной деятельностью институт решает важную проблему для сельскохозяйственной отрасли через производство семян высших репродукций, которое ежегодно достигает несколько тысяч тонн.

На этом важном участке работы показали себя высококвалифицированными специалистами и мастерами своего дела многие ученые – семеноводы: Н.П. Якименко, А.М. Курочкин, Н.А. Лобанов, М.Д. Варлахов, А.Ф. Путинцев и другие. Огромное признание своим кропотливым трудом с семенами заслужила кандидат с.х.н. Зоя Романовна Цуканова, а также научные сотрудники В.И. Мурзенкова, И.П. Анисимов, А.И. Ерохин и другие.

Ученые института активно пропагандируют и внедряют научные разработки в сельскохозяйственное производство области, региона, России, издают методические рекомендации, выступают на совещаниях, семинарах, конференциях, обмениваются селекционным материалом, опытом работы с отечественными учреждениями и зарубежными организациями, фирмами. И сегодня в работе нашей конференции принимает участие представитель Итальянского национального агентства

по новым технологиям, энергетики и устойчивому экономическому развитию.

В институте сложился довольно стабильный коллектив исследователей и специалистов, достойно принявших эстафету и традиции предыдущих поколений, заложивших фундамент научных идей. Соблюдается принцип преемственности, продолжает функционировать аспирантура, осуществляется издательская деятельность.

Подводя итоги деятельности и подчеркивая значение научных разработок института в повышении эффективности производства зернобобовых и крупяных культур, можно с уверенностью сказать, что коллектив ученых справляется со стоящими перед ними задачами по научному обеспечению агропромышленного комплекса России.

ROLE AND VALUE OF RESEARCHES OF VNIIZBK IN INCREASE OF PRODUCTION EFFICIENCY OF LEGUMES AND GROAT CROPS

V.I. Zotikov, director, Dr. Sci. Agric.,
professor

State Scientific Institution the All-Russia Research
Institute of Legumes and Groat Crops

Key words: Variety, breeding, seed-growing, agriculture, plant growing, peas, vetch, soya, lentil, bean, fodder legumes, buckwheat, millet.

УДК 635.656:576.8:631.461.5

СПЕЦИФИЧНОСТЬ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ БОБОВЫХ КУЛЬТУР И ОСОБЕННОСТИ ИХ ПРОИЗВОДСТВА

И.А. ТИХОНОВИЧ¹, А.Ю. БОРИСОВ¹, А.Г. ВАСИЛЬЧИКОВ², В.А. ЖУКОВ¹,
А.П. КОЖЕМЯКОВ¹, Т.С. НАУМКИНА², В.К. ЧЕБОТАРЬ¹, О.Ю. ШТАРК¹, В.В. ЯХНО¹

¹ ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,

² ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур

Ключевые слова: Микробно-растительные взаимодействия, симбиоз, инокуляция, полезная микрофлора, удобрения, азот.

Введение

Основной чертой современного сельскохозяйственного производства является повышенное внимание к ресурсообеспечению, и, в наибольшей

степени, – ресурсосбережению. Затраты на производство и применение азотных минеральных удобрений составляют одну из главных энергетических затрат АПК. Вследствие высокой стоимости азотных удобрений, их применение в российском сельскохозяйственном производстве составляет не более одной трети от потребности. Использование альтернативных источников азота является актуальной задачей не только по причине дефицита удобрений, но и в связи с необходимостью введения адаптивных систем земледелия, где возможности микроорганизмов могут быть использованы для обеспечения самых различных потребностей растения. Осуществление этой задачи зависит от степени изученности микробно-растительных взаимодействий, среди которых наиболее подробно исследованным является азотфиксирующий симбиоз клубеньковых бактерий и бобовых растений.

Бобовые обладают уникальной способностью преодолевать дефицит связанного азота в почве благодаря формированию симбиоза с клубеньковыми бактериями. Растение образует новые органы – клубеньки, – в которых происходит фиксация молекулярного азота посредством одного из наиболее сложных и необходимых для поддержания жизни на Земле ферментов – нитрогеназы. Важно отметить, что возникающая при этом микробно-растительная система обладает новым признаком – азотфиксацией, которого не было ни у одного из партнеров до объединения.

Биологическая азотфиксация определяет преимущества возделывания бобовых культур в мире и, в частности, в нашей стране. Количество азота, которые при этом могут быть накоплены в почве, составляет до 600 кг на гектар, что намного превышает потребности самого бобового и обеспечивает связанным азотом последующие культуры (Берестецкий и др., 1987). Отсюда ясно, что выращивание бобовых, наиболее полно реализующих свой симбиотический потенциал, способно заменить значительную долю минеральных удобрений, как для самой бобовой культуры, так и для последующих культур, за счет обогащения почвы азотом.

Однако в реальных условиях почвы данная возможность реализуется только при определенных условиях:

- наличия в почве эффективных и специфических штаммов клубеньковых бактерий;
- способности бобовых использовать биологический азот вместо минерального;
- технологии возделывания, обеспечивающей азотный статус почвы и другие условия, благоприятные для образования симбиоза.

В обычных условиях уровень актуальной азотфиксации в несколько раз ниже своего биологического максимума. Данное обстоятельство заставляет применять азотные удобрения на бобовых культурах наравне с остальными сельскохозяйственными культурами, что является необоснованным завышением энергозатрат и экологического риска, а также ведет к снижению почвенного плодородия. Преодолеть эти недостатки ученые пытаются уже более 100 лет, с тех пор, когда профессор М. Бейеринк (Beijerinck, 1901), а в нашей стране Борис Лаврентьевич Исаченко предложили использовать препарат клубеньковых бактерий для инокуляции бобовых (Мишустин, Емцев, 1987). Инокуляция препаратами клубеньковых бактерий значительно повышает эффективность симбиоза, но также не обеспечивает достижение ее максимального уровня.

Необходимость применения препаратов диктуется тем, что в почве преобладают штаммы бактерий, имеющие невысокую эффективность азотфиксации. Способность бактерий к симбиозу определяется генами, локализованными не в основной хромосоме, а в плазмидах (Fisher, 1994), которыми бактериальные клетки могут активно обмениваться, осуществляя горизонтальный перенос генов (Проворов, Воробьев, 2010), либо просто утрачивать их, теряя и способность к азотфиксации. Поскольку в почве в свободном состоянии клубеньковые бактерии азот не фиксируют, их выживаемость вне растения не зависит от потенциальной способности к азотфиксации, которая наступает только при взаимодействии с бобовыми. По этой причине большинство природных штаммов клубеньковых бактерий имеют низкую эффективность симбиотической азотфиксации, либо не способны к ней вообще. Такие штаммы, однако, не

утрачивают вирулентности (способности к проникновению в ткани растения) и зачастую оккупируют клубеньки бобовых культур весьма активно, вытесняя производственные штаммы, вносимые в виде микробиологических препаратов. Это значительно понижает эффективность действия препаратов, и зачастую проявляется в экспериментальных условиях как отсутствие положительного влияния инокуляции микробиологическим препаратом.

Для некоторых культур, таких как соя и козлятник, в почвах России отсутствуют специфические клубеньковые бактерии, способные взаимодействовать с этими бобовыми. Поэтому данные культуры, в отличие от многих других, характеризуются высокой отзывчивостью на обработку микробиологическими препаратами клубеньковых бактерий, значительно повышая урожай благодаря взаимодействию с вносимыми штаммами. Таким образом, решение проблемы заселения корней бобовых эффективными или неэффективными штаммами клубеньковых бактерий тесно связано с понятием специфичности симбиотических взаимоотношений.

Специфичность азотфиксирующего симбиоза

Специфичность симбиотических взаимодействий, известная уже более 80 лет, проявляется в том, что определенные виды (иногда отдельные штаммы) клубеньковых бактерий взаимодействуют только с определенными видами (иногда отдельными генотипами) растений-хозяев (Fred et al., 1932; Wang et al., 2012). Изменить специфичность невозможно никакими физиологическими воздействиями, так как она определяется генетическими механизмами, и поэтому, только меняя генотип штамма клубеньковых бактерий, можно изменить и его отношение к растению-хозяину. Современная фундаментальная наука достигла значительных успехов в расшифровке механизмов, обеспечивающих специфичность азотфиксирующего симбиоза бобовых растений и клубеньковых бактерий. Свой вклад в решение этого вопроса удалось внести и авторам.

По современным представлениям, специфичность взаимодействия обеспечивается на уровне передачи сигналов – при узнавании парт-

нерами друг друга. В отсутствие органов чувств бактерии и растения используют сигнальные молекулы, которые позволяют однозначно опознать партнера. Взаимодействие начинается с получения бактериями сигнала от растения – молекул флавоноидной природы, набор которых специфичен для конкретного вида бобового растения. Этот сигнал, связываясь с бактериальным рецептором, активирует транскрипцию бактериальных генов клубенькообразования, неактивных в отсутствие хозяина (Ovtsyna, Staehelin, 2003). Эти гены получили свое название потому, что выключение любого из них ведет к отсутствию клубеньков у растения. Результатом экспрессии указанных генов является ферментативный синтез сигнальных молекул хитиновой природы – нод-факторов (от англ. nodule – клубенек), обладающих поразительной активностью: ранние симбиотические реакции растения проявляются при воздействии нод-факторов в концентрациях порядка 10^{-10} моль/л (D'Haese, Holsters, 2002). Набор генов, определяющих выработку нод-фактора, к настоящему времени достаточно хорошо описан (Spaink et al., 1991). Поэтому, манипулируя ими с помощью методов молекулярной генетики, можно менять спектр нод-факторов, вырабатываемых бактериями и, следовательно, изменять специфичность взаимодействия и тем самым регулировать заселение корней бобовых нужными штаммами клубеньковых бактерий.

Еще в 1928 году сотрудниками ВИР был выделен образец гороха из Афганистана (Говоров, 1928), который для своей инокуляции требовал очень специфических штаммов, которые производили необычный нод-фактор. Необычность его заключалась в наличии в структуре молекулы дополнительной ацетильной группы, присоединение которой контролируется бактериальным геном *NodX* (Davis et al., 1988). Со стороны растения способность к образованию клубеньков лишь в ответ на действие такого нод-фактора контролируется единственным геном *Sym2* (Lie, 1984). С использованием серии возвратных скрещиваний в сорта гороха посевного были введены определенные аллели *Sym2*, что привело к повышению специфичности взаимодействия растений с клубеньковыми бактериями (Наумкина и др., 2011). Так

был создан ряд сортов (Норд, Битюг, Демон), способных образовывать клубеньки лишь со штаммами бактерий, имеющими ген *NodX*. Применение указанных штаммов для инокуляции этих сортов имело положительный эффект в полевых условиях (Tikhonovich et al., 1997), поскольку растения взаимодействовали лишь с вносимыми штаммами, но не с остальными неэффективными азотфиксаторами, которые присутствовали в подавляющем большинстве в почве.

Детальное изучение механизмов взаимодействия растений с клубеньковыми бактериями открывает возможности для создания наиболее специфических комбинаций сорт-штамм с целью повышения конкурентоспособности промышленных штаммов, а также для достижения максимальной эффективности симбиотической азотфиксации в полевых условиях.

Производство микробиологических препаратов

С учетом специфичности взаимодействия растений и микроорганизмов должно развиваться и производство микробиологических препаратов, основанное на региональном принципе под общим контролем. Такой принцип позволит обеспечить производство всей линейки препаратов для бобовых растений, которые высеваются в конкретном регионе (а их может быть более 20 видов). Современный уровень развития науки делает актуальным подбор штаммов микроорганизмов не только под конкретную культуру, но и под отдельные, наиболее отзывчивые на инокуляцию, сорта. Следовательно, производство должно гибко реагировать на годовые изменения структуры посевных площадей под бобовые культуры, что может быть осуществимо в пределах региона, но не в более масштабном производстве. Поэтому последние 10-15 лет во ВНИИСХМ разрабатывается концепция развития микробиологического производства по региональному принципу, которая также отвечает требованиям специфичности микробиологических препаратов.

Усилиями сотрудников ВНИИСХМ и ВНИИЗБК удалось обеспечить научно-техническое сопровождение организации производства препаратов для создания микробно-растительных систем. Согласно сформулированной концепции, произ-

водство основывается, во-первых, на строгой штаммовой политике: культуры симбиотически эффективных бактерий должны храниться в неизменном состоянии в специальной коллекции. Эти культуры производители могут получать только из указанной коллекции, поскольку именно там обеспечиваются наиболее адекватные условия для сохранения в штаммах полезных свойств, которые, как уже указывалось, являются необязательными для самих бактерий и легко теряются при неадекватном хранении. Во ВНИИСХМ создан уникальный – второй в Европе – роботизированный комплекс для хранения микроорганизмов при температуре -80°C , что обеспечивает хранение штаммов без потери полезных свойств в течение десятилетий. Такой комплекс максимально защищен от внешних воздействий и гарантирует автору штамма, поместившему его в коллекцию, полный контроль над культурой (в т.ч. выдачу штамма лишь с разрешения автора). В настоящее время ведется активная работа по насыщению коллекции полезных микроорганизмов в данном комплексе, направленная на то, чтобы генетические резервы полезной для сельскохозяйственной практики микрофлоры были сохранены в полном объеме в состоянии, готовом к использованию.

Второй компонент концепции – это формы препарата, которые могут содержать различные носители. В течение долгих 25 лет единственной формой микробиологического препарата под бобовые, которая была известна в стране, являлся ризоторфин – бактерии находились в стерильном или нестерильном торфе, что обеспечивало им весьма длительный срок хранения, достаточный для транспортировки, хранения и применения препарата. За прошедшее время применение ризоторфина оказало огромное положительное влияние на плодородие почвы, сбор белка и другие показатели. За эти годы было выпущено ризоторфина на сумму около 1 млрд. рублей, ежегодно обрабатывалось до 300 тыс. га посевов бобовых. Однако, с учетом того, что площади только под зернобобовыми культурами составляют 2,5 млн. га (а вместе с кормовыми многолетними травами цифра возрастает до 3 – 3,2 млн. га), объем производства препарата должен быть увеличен как минимум в семь раз. Эффективность препарата, производимо-

го в настоящее время, достаточно высока, особенно при применении под сравнительно новые культуры, такие как соя, люцерна (табл. 1, 2). Положительное влияние ризоторфина проявляется как в

увеличении урожая, так и в дополнительном сборе белка. Благодаря невысокой стоимости препарата, его применение приносит не менее 5 рублей на один рубль вложенных средств.

Таблица 1. Влияние ризоторфина на содержание протеина, продуктивность растений и сбор белка основных бобовых культур.

Культура	Средний урожай, ц/га		Содержание сырого протеина (на сух. к-во), %		Сбор протеина, кг/га		Прибавка к контролю, %
	контроль	ризоторфин	контроль	ризоторфин	котроль	ризоторфин	
Горох: зерно	22,7	23,8	22,1	24,4	502	528	15,7
зеленая масса	155,0	169,0	16,0	17,2	620	730	17,0
Соя (зерно)	17,9	22,9	30,2	35,8	542	822	52,0
Люпин(зерно)	19,4	21,5	30,9	33,8	599	727	21,4
Клевер (сено)	60,5	65,5	15,3	16,5	825	1082	26,5
Люцерна (зел.масса)	362,0	420,0	17,8	20,1	1285	1690	31,5

Таблица 2. Эффективность ризоторфина в регионах России.

Место проведения опытов, почва	Культура	Прибавка от инокуляции, %	Дополнительное накопление белка, кг/га	%, к контролю
Мурманская обл. <i>Дерново-сильно-подзолистая</i>	Клевер	24	225	35
	Вика	30	190	40
Республика Коми <i>Дерново-подзолистая</i>	Клевер	25	360	34
Респ. Карелия <i>Дерново-подзолистая</i>	Клевер	44	340	36
Вологодская обл. <i>Дерново-подзолистая</i>	Козлятник	40	440	49
Ленинградская обл. <i>Дерново-подзолистая</i>	Козлятник	31	420	42
Московская обл. <i>Дерново-подзолистая</i>	Люцерна	33	470	51
Орловская обл. <i>Тёмно-серая лесная</i>	Горох	16	150	21
	Люпин	11	135	17
Брянская обл. <i>Серая лесная</i>	Горох	18	240	27
	Люпин	19	330	27

При всех достоинствах отечественного ризоторфина, производство и применение его требует определенной затраты ручного труда. За последнее время в страну проникли импортные микробиологические препараты под сою, которые поступают вместе с семенами, и, естественно, создают конкуренцию на отечественном рынке. Конкурентоспособность импортных продуктов связана в основном с формой препарата. В связи с этим нами были предприняты попытки создать жидкую форму препарата, в которой отсутствует носитель. В схеме производства такой формы главным процессом становится стабилизация препарата за счет различных добавок. Нам удалось создать оригинальную композицию, которая, будучи введенной в препарат, обеспечивает значительное продление выживания культур. Такая форма, хотя и предъяв-

ляет более жесткие требования к культуре производства, более рентабельна, а главное – ее применение легко поддается механизации. Средства механизации, в частности сеялки точного высева с внесением жидких удобрений, хорошо подходят для внесения препарата клубеньковых бактерий. Применение такой жидкой формы препарата уже испытано в ряде хозяйств на различных культурах (табл. 3). Новая форма не уступает по эффективности традиционным препаратам и благодаря этому представляется весьма перспективной. Таким образом, предприятие-производитель может выпускать линейку разных форм микробиологического препарата, которые будут подходить различным потребителям, соответственно их потребностям.

Таблица 3. Эффективность применения новой формы биопрепаратов на зернобобовых культурах.

Зернобобовые культуры (область)	Сорт	Урожайность зерна, ц/га		Прибавка	
		контроль	ризоторфин	ц/га	%
Фасоль (Орловская область)	Гелиада	13,7	16,3	2,6	19,0
Кормовые бобы (Мордовия)	Янтарный	23,3	28,4	5,1	21,9
Чечевица (Ростовская область)	Л-68-03	7,1	10,7	3,6	50,7
Чина (Ростовская область)	Степная 21	13,2	18,1	4,9	37,1
Нут (Ростовская область)	Краснокутский 36	21,3	32,4	11,1	52,1

Опыт работы производств, выпускающих микробиологические препараты под бобовые культуры, можно продемонстрировать на двух примерах – производства в Санкт-Петербурге и в Казани. Типичное производство выглядит следующим образом: 20-25 работников, стоимость основных фондов 25-30 млн. рублей, прибыль – около 25%. Основным недостатком производства является его сезонность. Однако этот недостаток перекрывается тем фактом, что предприятие способно производить и другие микробиологические

препараты, например, препараты для небобовых культур.

Заключение

Важнейшим фактором эффективности симбиотического взаимодействия является реакция растения на симбиоз, то есть отзывчивость растений на инокуляцию микробиологическими препаратами. Создавая сорта с учетом данного признака, мы повышаем их способность к взаимодействию со всем комплексом полезной микрофлоры, делая их максимально самодостаточными по от-

ношению к оптимизации азотного и фосфорного питания, защите от многих патогенов, различных стрессов биотической и абиотической природы, включая засуху. Конечной целью работы является обеспечение возможности инокуляции для всех посевов бобовых в нашей стране, что позволит получить дополнительно не менее 1 млн. тонн белка, сэкономить до 1 млн. тонн азотных удобрений, до 5 млн. тонн нефти, существенно снизить экологический риск и обеспечить повышение плодородия почв. При этом мы считаем уместным подчеркнуть, что использование симбиотической азотфиксации, обладающее немалым инновационным потенциалом, не исключает наращивания производства и доступности азотных удобрений для российских производителей сельскохозяйственных товаров. Иными словами, оптимальным путем развития российского АПК, по нашему мнению, является рациональное сочетание использования биологического и минерального азота.

Благодарности

Выполнение работы поддержано грантами РФФИ (10-04-00961, 10-04-01146, 12-04-01867) и грантами и государственными контрактами Минобрнауки РФ (НШ–337.2012.4, (П1304, ГК 16.512.11.2155).

Литература

1. Берестецкий О.А., Доросинский Л.М., Кожемяков А.П. Эффективность препаратов клубеньковых бактерий в Экспериментальной Географической Сети. // АН СССР, серия Биология. 1987. N 5, С. 670-679.
2. Говоров Л.И. Горох Афганистана // Труды по прикл. бот. генет. селек. 1928. Т.19. Вып.2. С.497-522.
3. Мишустин Е.Н., Емцев, В.Т. Микробиология. – М.: Агропромиздат, 1987. 368 с.
4. Наумкина Т.С., Борисов А.Ю., Штарк О.Ю., Васильчиков А.Г., Молошонок А.А., Барбашов М.В., Донская М.В. Использование симбиозов бобовых при создании высокоэффективных растительно-микробных систем для адаптивного растениеводства //Аграрная Россия. - № 3. - 2011. - С.35-37
5. Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Роль горизонтального переноса генов в эволюции клубеньковых бактерий, направляемой растением-хозяином. Усп. совр. биол., 2010, 130: 336-345.
6. Beijerinck, M.W, 1901, Über oligonitrophile Mikroben, Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung II, Vol 7, P. 561-582
7. D'Haese W, Holsters M. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* 2002;12(6).– P. 79-105.
8. Davis E.O., Evans I.J., Johnston A.W.B. Identification of *nodX*, a gene that allows *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain TOM to nodulate Afghanistan peas // *Mol. Gen. Genet.* 1988. P.531-535.
9. Fisher H.M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.*,1994, 58.–P. 352-386.
10. Fred E.B., Baldwin I.L., McCoy E. (1932) Root nodule bacteria and leguminous plants. Univ. Wisconsin Stud Sci, Madison.
11. Lie T.A. Host genes of *Pisum sativum* L. conferring resistance to European *Rhizobium leguminosarum* strains // *Plant Soil.* 1984. V.82. P.462-465.
12. Ovtyna AO, Staehelin C. Bacterial signals required for the Rhizobium-legume symbiosis. In: Pandalai SG. (ed) Recent Research Developments in Microbiology, Vol 7 (Part II). Trivandrum, India: Research Signpost; 2003. – P.631-648.
13. Spaink H.P., Sheeley D.M., van Brussel A.A., Glushka J., York W.S., Tak T., Geiger O., Kennedy E.P., Reinhold V.N., Lugtenberg B.J. (1991) A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* 354(6349).–P.125–130.
14. Tikhonovich I.A., Kozhemyakov A.P., Provorov N.A. Genetic potential of plants for improving the beneficial microbe interactions. NATO ASI series. In: Biological fixation of nitrogen for ecology and sustainable agriculture /A. Legocki, H.Bothe, A. Puhler (eds.). Berlin, 1997.–P. 191-194.
15. Wang D., Yang S., Tang F., Zhu H. Symbiosis specificity in the legume: rhizobial mutualism. *Cell Microbiol.* 2012;14(3).–P. 334-42.

SPECIFICITY OF MICROBIOLOGIC PREPARATIONS FOR BEAN CROPS AND FEATURES OF ITS PRODUCTION

I.A. Tikhonovich¹, A.Ju. Borisov¹, A.G. Vasilchikov²,
V.A. Zhukov¹, A.P. Kozhemjakov¹, T.S. Naumkina²,
V.K. Chebotar¹, O.Ju. Shtark¹, V.V. Jahno¹

¹ State Scientific Institution the All-Russia Research Institute of Agricultural Microbiology,

² State Scientific Institution the All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops

Key words: plant-microbe interactions, symbiose, inoculation, beneficial microflora, fertilizings, nitrogen.