

УДК 579.64

БИОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ВСХОЖЕСТИ СЕМЯН И СТИМУЛЯЦИИ РОСТА КОРМО-БОБОВЫХ КУЛЬТУР**Смирнова И.Э., Баймаханова Г.Б., Файзулина Э.Р., Татаркина Л.Г.***ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы,
e-mail: iesmirnova@mail.ru*

Приоритетным направлением развития сельского хозяйства является животноводство, сдерживающим фактором которого является недостаточность кормовой базы. Основной кормо-бобовой культурой является люцерна (*Medicago sativa* L.), не менее важной культурой является донник (*Melilotus sp.*). Одним из путей увеличения производства кормов является повышение их урожайности. Однако при их выращивании существует проблема низкой всхожести семян. Для повышения всхожести применяются различные способы, наиболее часто применяют механическую скарификацию, которая требует специального оборудования, больших затрат энергии и труда. В этой связи разработка биологического способа повышения всхожести семян кормо-бобовых культур является актуальной. Целью исследования является изучение способности целлюлолитических бактерий повышать всхожесть семян, стимулировать рост и развитие донника и люцерны, отбор наиболее эффективных штаммов и разработка на их основе биологического способа. Объектами исследования служили целлюлолитические бактерии, выделенные из почв и целлюлозосодержащих растительных остатков (Алматинская область, Казахстан). В опытах использовали сорта донника «Аркас» и «Желтый» и люцерны «Семиреченская» и «Семиреченская новая». Полевые испытания проводили в Алматинской, Кызылординской и Восточно-Казахстанской областях Казахстана, отличающихся по климатическим и почвенным условиям. В лабораторных и полевых опытах изучено влияние целлюлолитических бактерий на всхожесть семян, рост и развитие растений донника и люцерны. Установлено, что предпосевная инокуляция семян донника и люцерны повышает полевую всхожесть до 87,0% и существенно стимулирует их рост и развитие. При этом длина стеблей и корней этих культур увеличивается более чем в 2,0 раза. Отобраны три наиболее эффективных штамма целлюлолитических бактерий – два штамма для донника и один для люцерны. На основе этих штаммов целлюлолитических бактерий разработан биологический способ повышения всхожести семян, стимуляции роста и развития кормо-бобовых культур донника и люцерны.

Ключевые слова: целлюлолитические бактерии, штаммы, донник, люцерна, всхожесть, стимуляция, биологический способ

BIOLOGICAL METHOD OF INCREASING GERMINATION OF SEEDS AND STIMULATION OF GROWTH OF FORAGE-LEGUMES**Smirnova I.E., Baymakhanova G.B., Fayzulina E.R., Tatarkina L.G.***Research and Production Center for Microbiology and Virology LLC, Almaty,
e-mail: iesmirnova@mail.ru*

The priority for the development of agriculture is animal husbandry, the constraining factor of which is the lack of fodder. The main fodder crops are alfalfa (*Medicago sativa* L.) and sweet clover (*Melilotus sp.*). One way to increase forage production is to increase the yield. However, sweet clover and alfalfa have low seed germination. To increase the germination of seeds, various methods are used, the most commonly used is mechanical scarification, which requires special equipment, high energy and labor costs. In this regard, the development of a biological method for increasing the germination of seeds is relevant. The goal was to study the ability of cellulolytic bacteria to increase seed germination, stimulate the growth of sweet clover and alfalfa, select effective strains and develop a biological method. The objects of study were cellulolytic bacteria isolated from soils and cellulose-containing residues (Almaty region, Kazakhstan). The varieties of sweet clover “Arkas” and “Yellow” and alfalfa “Semirechenskaya” and “Semirechenskaya Novaya” were used. Field experiments were carried out in Almaty, Kyzylorda and East Kazakhstan regions with differ in climatic and soil conditions. In laboratory and field conditions, the effect of bacteria on germination, growth of sweet clover and alfalfa was studied. Pre-sowing inoculation increased field germination to 87.0% and stimulated plant growth (length stems and roots increased more than 2.0 times) was found. Three effective strains were selected (two strains for sweet clover and one for alfalfa). A biological method for increasing seed germination, stimulating the growth of sweet clover and alfalfa based on these strains was developed.

Keywords: cellulolytic bacteria, strains, sweet clover, alfalfa, germination, stimulation, biological method

Одним из приоритетных направлений развития сельскохозяйственного сектора во всем мире является животноводство, сдерживающим фактором развития которого является недостаточность кормовой базы [1]. Возможным путем решения этой проблемы является повышение урожайности кормовых культур [2]. Основной кормо-бо-

бобовой культурой является люцерна, которую возделывают на зерно и зеленую массу. Не менее важной культурой является донник, который хорошо растет и развивается на засоленных почвах и является перспективным фитомелиорантом. Трава люцерны и донника характеризуется высоким содержанием протеина, в состав которого вхо-

дят основные незаменимые аминокислоты (лизин, валин, триптофан, метионин и др.). Содержание этих аминокислот в белке донника и люцерны в 1,5–3,0 раза выше, чем в белке зерновых [3]. Также кормо-бобовые культуры активно фиксируют азот атмосферы и оставляют его с пожнивными остатками в почве (до 40–100 кг азота на гектар, что приравнивается к 10–20 т/га навоза) [4]. Можно сказать, что выращивание донника и люцерны способствует повышению плодородия почв, приводит к накоплению биологического азота и гумуса в почве и обеспечивает структурирование почвы [5]. В будущем эти культуры будут занимать ведущее место в органическом земледелии для поддержания плодородия почв [6].

Однако при выращивании этих культур существует проблема плохой всхожести семян, что связано с биологической особенностью их строения. Часть семян донника и люцерны (30–70%) имеет твердую, непроницаемую для воды оболочку, поэтому они не могут прорасти сразу после посева [7]. Это свойство называется твердокаменностью семян. Из-за твердой оболочки семена при высеве не дают дружных всходов, что создает разреженность посевов и значительно снижает урожайность зеленой массы этих культур с единицы площади [8].

Проблемой снижения твердокаменности семян кормо-бобовых культур занимаются США, Индия, Китай, многие страны Европы и Латинской Америки, Россия и др. Разработаны и применяются физические, химические и механические способы повышения всхожести семян этих культур [9, 10]. В сельском хозяйстве на практике наиболее часто применяют механическую скарификацию, при которой твердую оболочку семян разрушают, пропуская их через специальные машины-скарификаторы [11]. Этот метод требует специального оборудования, больших затрат энергии и труда. Кроме того, механическое воздействие вызывает повреждение не только оболочки, но и зародыша семени, что приводит к его поражению микробами, плесневению, загниванию проростков, и значительная часть посевного материала пропадает [12]. В этой связи разработка доступного, экологически чистого и эффективно-го способа повышения всхожести семян кормо-бобовых культур очень актуальна. Всем этим требованиям отвечает биологический способ повышения всхожести семян, основанный на использовании специально селекционированных микроорганизмов – целлюлолитических бактерий. Эти бактерии синтезируют особые ферменты – целлюлазы, которые частично

разрушают целлюлозу твердой оболочки семян, образуя в ней микротрещины. Нарушенная оболочка становится более легкой для прорастания зародыша, тем самым повышается всхожесть семян. Применение биологического способа более эффективно, чем механическая скарификация, так как бактерии обладают избирательным действием – частично разрушают только твердую оболочку и не повреждают семядоли и зародыш семян. Способ не требует специального оборудования и больших энергетических и материальных затрат.

Для разработки биологического способа необходимо изучить влияние целлюлолитических бактерий на всхожесть семян, стимуляцию роста и развития донника и люцерны и отобрать наиболее эффективные штаммы. На основе способа в дальнейшем планируется разработка биоудобрения для повышения всхожести семян и стимуляции роста кормо-бобовых культур. Созданное биоудобрение будет отвечать требованиям охраны окружающей среды и способствовать развитию органического сельского хозяйства, так как бактерии, входящие в его состав, являются естественными представителями почвы и участвуют в повышении ее плодородия.

Целью данного исследования является изучение способности целлюлолитических бактерий повышать всхожесть семян, стимулировать рост и развитие растений донника и люцерны, отбор наиболее эффективных штаммов и разработка биологического способа.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили целлюлолитические бактерии, выделенные из почв и целлюлозосодержащих растительных остатков, собранных на полях донника и люцерны в Алматинской области Казахстана в 2020 г. В опытах использовали два сорта донника «Аркас» и «Желтый» и люцерны (*Medicago sativa* L.) «Семиреченская» и «Семиреченская новая». Сорт «Аркас» относится к доннику белому (*Melilotus albus* Medik.) и характеризуется низким содержанием алкалоида кумарина, сорт «Желтый» относится к доннику лекарственному (*Melilotus officinalis* Pall.) и является отличным медоносом. Все сорта рекомендованы для выращивания в юго-восточном регионе Казахстана и широко используются фермерами.

Культивирование целлюлолитических бактерий проводили в жидкой селективной среде Гетчинсона на шейкере при 180 об/мин и на твердых питательных средах (среда Гетчинсона, МПА) при температуре 28°C.

Лабораторные опыты по изучению влияния целлюлолитических бактерий на всхожесть семян и рост растений донника и люцерны проводили в климатической камере роста (Constant Climate Chamber HPP-750, «Mettmert», Germany). Параметры режима камеры роста: световой день – 12 ч, температура 25 °С, освещенность: холодный белый свет 6500 К, теплый свет 2700 К; ночной режим – 12 ч; температура 15 °С, влажность 65%. Для обработки семян использовали бактериальные суспензии с титром 1×10^8 кл/мл из расчета 15 мл на 100 г семян. Время обработки семян при комнатной температуре составляло 2 ч. Контролем служили семена, замоченные в стерильной водопроводной воде. Семена высевали в сосуды с почвой на 250 мл. Количество семян составляло 7 растений на сосуд. Длительность опытов составляла 30 дней. Повторность опытов пятикратная. Всхожесть семян определяли посредством подсчета проросших семян в опытах и контроле. Оценку ростостимулирующего действия производили путем измерения длины стебля, корней, подсчета числа листьев на одно растение, обработанных бактериями, и сравнивали их с соответствующими показателями в контроле [13].

Полевые мелкоделяночные опыты проводили в трех областях Казахстана, отличающихся по климатическим и почвенным условиям (Алматинская, Кызылординская и Восточно-Казахстанская области). Семе-

на перед посевом обрабатывали суспензиями бактерий с титром 1×10^8 кл/мл, из расчета 200–250 мл на гектарную норму семян. Время обработки составляло 2 ч, температура 23–25 °С. Контролем служили семена без обработки.

Титр бактериальной суспензии определяли методом прямого подсчета при высеве на питательные среды [14].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «STATISTICA 10.0» [15].

Результаты исследования и их обсуждение

Сбор образцов почв и целлюлозосодержащих остатков был проведен в 2020 г. на полях Алматинской области Казахстана, где выращивали донник и люцерну. В общей сложности было собрано 84 образца, из них выделены 54 чистые культуры целлюлолитических бактерий. Проведен первичный скрининг бактерий по признаку целлюлазной активности и отобрано шесть штаммов бактерий с высокой целлюлазной активностью (С-21(18)N, С-21N2, С-21(2)AS, С-22TN, С-182К, С-604N).

В лабораторных условиях были проведены опыты по изучению влияния отобранных штаммов целлюлолитических бактерий на всхожесть семян и стимуляцию роста донника и люцерны. Полученные данные представлены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние целлюлолитических бактерий на всхожесть семян, рост и развитие донника и люцерны в лабораторных опытах

Варианты опыта	Всхожесть семян, %	Длина стебля, см	Длина корня, см	Кол-во листьев, шт.	Количество корней, шт.
Донник «Аркас»					
Контроль	36,3	7,8±0,1	6,1±0,03	2,3±0,1	1,0±0,1
С-21(18)N	77,1	14,8±0,2	14,3±0,2	2,9±0,1	2,7±0,2
С-21N2	83,8	15,4±0,3	15,5±0,2	2,9±0,2	1,8±0,1
С-182К	73,5	18,5±0,2	15,2±0,1	2,7±0,1	2,4±0,1
С-21(2)AS	76,8	12,9±0,1	12,5±0,1	2,9±0,1	1,2±0,1
С-22TN	80,6	14,8±0,2	15,4±0,1	2,3±0,1	1,2±0,1
С-604N	77,2	14,9±0,1	13,5±0,2	2,1±0,1	3,3±0,1
Донник «Желтый»					
Контроль	40,3	6,2±0,1	5,9±0,1	1,8±0,1	1,1±0,1
С-21(8)N	77,2	14,8±0,3	13,6±0,2	2,6±0,2	2,1±0,1
С-21N2	79,5	16,8±0,2	16,9±0,1	2,9±0,2	1,2±0,1
С-82К	80,1	16,1±0,3	16,7±0,1	2,8±0,2	2,6±0,2
С-21(2)AS	78,2	15,6±0,2	13,5±0,1	2,7±0,1	1,9±0,05
С-22TN	83,5	12,9±0,1	16,8±0,2	2,4±0,1	1,4±0,1
С-604N	77,3	16,3±0,2	13,1±0,1	3,1±0,2	3,8±0,2

Окончание табл. 1

Люцерна «Семиреченская новая»					
Контроль	51,3	7,0±0,1	6,5±0,1	2,0±0,1	1,2±0,1
C-21(18)N	85,2	14,7±0,2	13,8±0,2	2,4±0,1	1,6±0,1
C-21N2	90,3	17,2±0,3	16,4±0,1	2,9±0,2	1,8±0,1
C-182K	89,3	17,7±0,1	16,5±0,2	2,7±0,1	1,8±0,1
C-21(2)AS	87,5	16,7±0,3	15,8±0,3	2,7±0,2	2,5±0,1
C-22TN	90,1	13,9±0,2	16,8±0,2	2,6±0,1	2,9±0,2
C-604N	77,2	17,4±0,2	15,7±0,3	2,9±0,2	1,9±0,1
Люцерна «Семиреченская»					
Контроль	49,2	6,1±0,1	5,4±0,06	2,3±0,1	1,1±0,08
C-21(18)N	80,8	15,5±0,3	14,6±0,1	2,7±0,1	1,7±0,06
C-21N2	90,2	17,9±0,2	17,4±0,1	2,4±0,2	1,8±0,04
C-182K	87,3	17,8±0,2	17,9±0,2	2,5±0,1	1,9±0,05
C-21(2)AS	84,6	16,7±0,1	15,9±0,1	2,3±0,2	2,8±0,2
C-22TN	89,8	16,8±0,2	16,9±0,2	2,4±0,1	1,7±0,05
C-604N	79,6	14,9±0,2	14,7±0,2	2,6±0,1	1,8±0,04

Примечание. $p < 0,05$.

Таблица 2

Влияние целлюлолитических бактерий на всхожесть семян, рост и развитие донника и люцерны в полевых опытах

Варианты опыта	Всхожесть, %	Длина стебля, см	Длина корня, см
Донник «Аркас»			
Контроль	30,3	26,5±0,1	24,3±0,1
C-21(18)N	76,9	59,9±0,2	53,8±0,2
C-182K	78,2	63,2±0,3	55,4±0,2
C-22TN	60,0	59,2±0,2	45,5±0,1
Донник «Желтый»			
Контроль	28,9	25,2±0,3	24,5±0,1
C-21(18)N	77,9	58,9±0,2	54,4±0,1
C-182K	78,3	60,3±0,2	55,4±0,2
C-22TN	65,7	56,6±0,3	52,6±0,2
Люцерна «Семиреченская новая»			
Контроль	43,2	26,5±0,3	23,6±0,1
C-182K	87,6	60,6±0,2	47,5±0,2
C-22TN	64,3	57,4±0,2	45,8±0,2
C-21(2)AS	78,6	59,7±0,5	47,2±0,3
C-21N2	87,3	61,2±0,5	47,7±0,2
Люцерна «Семиреченская»			
Контроль	38,6	26,2±0,1	23,8±0,1
C-182K	87,6	62,3±0,3	50,7±0,2
C-22TN	80,7	58,7±0,2	47,3±0,2
C-21(2)AS	75,0	56,8±0,2	45,8±0,1
C-21N2	87,5	63,5±0,1	50,9±0,2

Примечание. Уровень доверительной вероятности $p < 0,05$.

Из данных, приведенных в табл. 1, следует, что штаммы целлюлолитических бактерий значительно повышали всхожесть семян донника и люцерны. При этом всхожесть обработанных семян донника возросла до 83,8%, в контроле всхожесть донника сорта «Аркас» составляла только 36,3%, сорта «Желтый» – 40,3%. Обработка семян люцерны бактериями повышала их всхожесть до 90%, в контроле этот показатель у сорта люцерны «Семиреченская новая» составлял 51,3%, а у сорта «Семиреченская» – 49,2%. Также установлено, что обработка семян бактериями активно стимулировала развитие растений донника и люцерны. При этом длина стебля донника сорта «Аркас» увеличилась в 1,6–2,4 раза, корня – в 2,1–2,5 раза, длина стебля донника сорта «Желтый» – в 2,0–2,7, корня – в 2,2–2,9 по сравнению с контролем. Длина стеблей люцерны, обработанных бактериями, у сорта «Семиреченская новая» и «Семиреченская» увеличилась в 2,0–2,5 и 2,4–2,9 раза, корня – в 2,1–2,6 и 2,7–3,3 раза соответственно по сравнению с контролем. По результатам исследований были отобраны активные штаммы бактерий: три штамма (С-21(18)N, С-182К и С-22TN) для донника и четыре штамма (С-21N2, С-182К, С-21(2)AS и С-22TN) для люцерны.

Поскольку планируется применение биологического способа в полевых условиях с разными климатическими и почвенными характеристиками, полевые мелкоделячные опыты были проведены в трех областях Казахстана – Алматинской, Кызылординской и Восточно-Казахстанской, существенно отличающихся по своим почвенно-климатическим условиям. Для инокуляции семян использовали шесть штаммов целлюлолитических бактерий, отобранных в лабораторных опытах. В табл. 2 приведены результаты наиболее эффективных штаммов целлюлолитических бактерий.

Из данных, приведенных в табл. 2, следует, что полевая всхожесть семян донника сортов «Аркас» и «Желтый» была очень низкой – 30,3 и 28,9% соответственно. При обработке семян штаммами бактерий их всхожесть увеличилась до 78,2 и 78,6%. При этом длина стебля увеличилась в 2,2–2,4 раза, а корней – в 1,9–2,3 раза. Полевая всхожесть семян люцерны сорта «Семиреченская новая» составила 43,2%, а сорта «Семиреченская» – 38,6%. Обработка семян люцерны суспензией бактерий повысила их всхожесть до 87,6%. При этом длина стеблей сорта «Семиреченская новая» увеличилась в 2,2–2,3 раза, корней – в 1,9–2,0 раза, а длина стеблей сорта «Семиречен-

ская» – в 2,2–2,4 раза, корней в 1,9–2,1 раза по сравнению с контролем. Наиболее эффективно повышали всхожесть и стимулировали развитие донника штаммы С-21(18)N и С-182К, а люцерны – штамм С-21N2. Однако отмечено, что штамм С-182К также активно повышает всхожесть семян и стимулирует развитие люцерны, и его можно использовать под культуру люцерны.

Заключение

Таким образом, проведены лабораторные и полевые исследования по влиянию целлюлолитических бактерий на всхожесть, рост и развитие кормо-бобовых культур донника и люцерны. Установлено, что предпосевная инокуляция семян сортов донника и люцерны повышала их полевую всхожесть до 87,0% и существенно стимулировала их развитие. При этом длина стеблей и корней увеличивалась более чем в 2,0 раза. По результатам лабораторных и полевых испытаний отобраны три наиболее эффективных штамма целлюлолитических бактерий – два штамма для донника С-21(18)N и С-182К и один штамм для люцерны С-21N2. На основе этих штаммов целлюлолитических бактерий разработан биологический способ повышения всхожести семян, стимуляции роста кормо-бобовых культур донника и люцерны.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан, в рамках грантового проекта ИРН AP08855656.

Список литературы

1. Kulkarni K.P., Tayade R., Asekova S., Song J.T., Shannon J.G., Lee J.-D. Harnessing the potential of forage legumes, alfalfa, soybean, and cowpea for sustainable agriculture and global food security. *Frontiers in Plant Science*. 2018. Vol. 9. DOI: 10.3389/fpls.2018.01314.
2. Ingver A., Tamm Ü., Tamm I., Tamm S., Tupits I., Bender A., Koppel R., Narits L., Koppel M. Leguminous pre-crops improved quality of organic winter and spring cereals. *Biological Agriculture and Horticulture*. 2019. Vol. 35 (1). P. 46–60.
3. Blume L., Hoischen-Taubner S., Sundrum A. Alfalfa – a regional protein source for all farm animals. *Journal of Sustainable and Organic Agricultural Systems*. 2021. Vol. 71 (1). P. 1–13. DOI: 10.3220/LBF1615894157000.
4. Hua W., Luo P., An N., Cai F. Manure application increased crop yields by promoting nitrogen use efficiency in the soils of 40-year soybean-maize rotation. *Scientific reports*. 2020. Vol. 10. e14882. DOI:10.1038/s41598-020-71932-9.
5. Song Xin, Fang Chao, Yuan Zi-Qiang, Li Feng-Min. Long-Term growth of alfalfa increased soil organic matter accumulation and nutrient mineralization in a semi-arid environment. *Frontiers in Environmental Science*. 2021. Vol. 9. DOI: 10.3389/fenvs.2021.649346.
6. Kulkarni K.P., Tayade R., Asekova S., Song J.T., Shannon J.G., Lee J.D. Harnessing the potential of forage legumes, alfalfa, soybean, and cowpea for sustainable agriculture and global food security. *Frontiers in Plant Science*. 2018. Vol. 9. P. 1314.

7. Игнатъев С.А., Регидин А.А., Грязева Т.В., Горюнов К.Н. Динамика изменения твердосемянности сортов люцерны в зависимости от сроков хранения семян // *Зерновое хозяйство России* 2019. № 6 (66). С. 46–49.
8. Kokonov S., Ryabova T., Votintsev A., Mokeeva S., Vorobyeva S., Esenkulova O. Influence of presowing seed treatment on the yield of variegated alfalfa and eastern galega. *Plant Science Today*. 2021. Vol. 8 (2). P. 250–254. DOI:10.14719/pst.2021.8.2.1000.
9. Maldonado-Arciniegas F., Ruales C., Caviedes M., Ramirez D.X., León-Reyes A. An evaluation of physical and mechanical scarification methods on seed germination of *Vachellia macracantha* (Humb. & Bonpl. ex. Willd.). *Acta Agronomica*. 2018. Vol. 67 (1). P. 120–125. DOI: 10.15446/acag.v67n1.60696.
10. Hu X., Yang L., Zhang Z., Wang Y. Differentiation of alfalfa and sweet clover seeds via multispectral imaging. *Seed Science and Technology*. 2020 Vol. 48. P. 83-99. DOI:10.15258/sst.2020.48.1.11.
11. Koobonye M., Maule B.V., Mogotsi K. Mechanical scarification and hot water treatments enhance germination of *Leucaena leucocephala* (Lam.) seeds. *Livestock research for rural development*. 2018. Vol. 30 (1). URL: <http://www.lrrd.org/lrrd30/1/kbmo30015.html>.
12. Ghaleb W., Ahmed L.Q., Escobar-Gutierrez A.J., Julier B. The history of domestication and selection of Lucerne: A new perspective from the genetic diversity for seed germination in response to temperature and scarification. *Frontiers in Plant Science*. 2021. Vol. 11. e578121.
13. Посьпанов Г.С. *Растениеводство*. М.: Колосс, 2007. 612 с.
14. Нетрусов А.И., Котова И.Б. *Микробиология: теория и практика*. М.: Юрайт, 2019. 315 с.
15. Боровиков В.П. *Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA*. М.: Hotline-Telecom, 2016. 288 с.