

# Изучение нодуляции и азотфиксации у двух сортов вигны [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] при инокуляции разными штаммами ризобий (*Bradyrhizobium* sp.)

Ю.В. Фотев<sup>1</sup>✉, К.К. Сидорова<sup>2</sup>, Т.И. Новикова<sup>1</sup>, В.П. Белоусова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

Вигна (*Vigna unguiculata* L. Walp.) – перспективная овощная бобовая культура, представляющая интерес для сельскохозяйственного производства России. Изучено влияние инокуляции тремя штаммами *Bradyrhizobium* sp., полученными из коллекции микроорганизмов ФГБНУ ВНИИСХМ (г. Санкт-Петербург), на нодуляционную способность и азотфиксацию у двух новых сортов вигны (Сибирский размер и Юньнаньская). Все штаммы формировали азотфиксирующие клубеньки на обоих сортах вигны. Установлены сортовые различия вигны по способности образовывать клубеньки и активно фиксировать азот при использовании разных штаммов. У этих сортов выявлен высокий размах варьирования по нодуляционной способности: количество клубеньков в начале цветения на сорте Сибирский размер составляло 4–47 шт. на растение, а на сорте Юньнаньская – 17–117 шт. В контроле, без инокуляции, клубеньков не обнаружено. У сорта Сибирский размер максимальные значения массы клубеньков и азотфиксации (в начале цветения, через 48 дней после инокуляции) наблюдали при использовании штамма 164 0503 (03) – 0,79 г и 5155,3 нмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/раст./ч соответственно. У сорта Юньнаньская эти показатели составили 1,41 г и 5255,5 нмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/раст./ч при инокуляции штаммом 162 0501 (01) и по азотфиксации – 4673,0 нмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/раст./ч при инокуляции штаммом 03. Выявлена положительная корреляция между активностью азотфиксации и массой клубеньков:  $r = 0,78$  ( $p > 0,95$ ). Полученные данные свидетельствуют о том, что для образования эффективного симбиоза у сорта Сибирский размер перспективным является штамм 03 *Bradyrhizobium* sp., а у сорта Юньнаньская – штамм 01.

Ключевые слова: вигна; *Vigna unguiculata*; *Bradyrhizobium* sp.; торфяной субстрат; штаммы; инокуляция; нодуляция; активность азотфиксации.

## Study of nodulation and nitrogen fixation in two cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cultivars inoculated with different strains of *Bradyrhizobium* sp.

Yu.V. Fotev<sup>1</sup>✉, K.K. Sidorova<sup>2</sup>, T.I. Novikova<sup>1</sup>, V.P. Belousova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) is a vegetable legume with promise for agricultural production in Russia. The impact of inoculation with three strains of *Bradyrhizobium* sp. from the All Russian Institute of Agricultural Microbiology (St. Petersburg) on nodulation and nitrogen fixation on two cowpea cultivars, Sibirskiy razmer and Yunnanskaya, has been explored. All the strains used made both cultivars produce nitrogen fixing nodule. Differences between the varieties in the ability to form nodules and fix nitrogen following exposure to the different strains have been identified. High variation of the nodulation ability of both cultivars has been observed: at the beginning of flowering, the number of nodules per plant was 4–47 in Sibirskiy razmer and 17–117 in Yunnanskaya. Uninoculated vigna roots used as the control did not form nodules. At the beginning of flowering (48 days after inoculation) Sibirskiy razmer plants inoculated with strain 164 0503 (03) had the highest nodule weight per plant (0.79 g) and N<sub>2</sub> fixation rates (5155.3 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/plant/h). The corresponding measures in Yunnanskaya were 1.41 g and 5255.5 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/plant/h following exposure to strain 162 0501 (01) and 4673.0 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/plant/h following exposure to strain 03. Analysis showed a correlation between nitrogen fixation rate and nodule weight (pcs./plant),  $r = 0.78$  ( $p > 0.95$ ). Data obtained suggest that effective symbioses are achieved between Sibirskiy razmer and strain 03 as well as between Yunnanskaya and strain 01.

Key words: cowpea; *Vigna unguiculata*; *Bradyrhizobium* sp.; peat substrate; strains; inoculation; nodulation; activity of nitrogen fixation.

### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Фотев Ю.В., Сидорова К.К., Новикова Т.И., Белоусова В.П. Изучение нодуляции и азотфиксации у двух сортов вигны [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] при инокуляции разными штаммами ризобий (*Bradyrhizobium* sp.). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(3):348-354. DOI 10.18699/VJ16.099

### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Fotev Yu.V., Sidorova K.K., Novikova T.I., Belousova V.P. Study of nodulation and nitrogen fixation in two cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cultivars inoculated with different strains of *Bradyrhizobium* sp. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(3):348-354. DOI 10.18699/VJ16.099

ORIGINAL ARTICLE

Received 26.08.2015 г.

Accepted for publication 13.10.2015 г.

© AUTHORS, 2016

**В**игна (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) – перспективная для России и Сибири овощная культура семейства Fabaceae (Фотев и др., 2007), имеющая африканское происхождение (Piennag, van Wyk, 1992), достоинства которой давно оценили жители Китая, выращивающие ее повсеместно и в большом количестве. В предисловии к монографии В.В. Singh, посвященной вигне (2014), отмечается, что за последнее десятилетие произошел 70 % рост мирового производства вигны, тогда как производство остальных бобовых культур сохранилось на прежнем уровне. Традиционно в пищу используют незрелые плоды, богатые белком, витаминами, а также макро- и микроэлементами (P, Fe, Mg и Mn) и пектином (Фотев, Белоусова, 2013; Наумова и др., 2014). Помимо питательной ценности, плоды вигны обладают великолепными вкусовыми качествами, пригодны для разных видов консервирования и заморозки, представляя собой ценный деликатесный продукт для пищевой промышленности и индустрии общественного питания России.

Выращиваемая во многих тропических и субтропических странах Старого и Нового Света между 35° с. ш. и 30° ю. ш., причем северная граница может доходить до 50° с. ш. (Вишнякова и др., 2012), вигна до недавнего времени не рассматривалась в качестве удачного кандидата для интродукции в условиях Средней полосы России и тем более Сибири. Причиной тому служили короткодневность, поздние сроки формирования плодов и низкая продуктивность большинства сортообразцов.

После продолжительного изучения сортов, форм и гибридов в Центральном сибирском ботаническом саду СО РАН (ЦСБС СО РАН) впервые в России в 2006 г. были созданы и включены в Государственный реестр селекционных достижений два сорта вигны, Сибирский размер и Юньнаньская (рис. 1). Эти сорта отличаются нейтральной реакцией на длину дня, коротким периодом от всходов до плодоношения (51–69 дней) и высокой стабильной урожайностью (2,1–2,9 кг/м<sup>2</sup>) (Фотев и др., 2007). До сих пор крупного агропромышленного производства вигны в стране нет, хотя востребованность культуры фермерскими хозяйствами и овощеводами-любителями из года в год растет. К 2015 г. количество ее сортов, зарегистрированных в Госреестре селекционных достижений Российской Федерации, возросло до 11 (Государственный реестр..., URL: [http://www.gossort.com/ree\\_cont.html](http://www.gossort.com/ree_cont.html)).

Одной из особенностей вигны как бобового растения является способность к симбиозу с почвенными азотфиксирующими бактериями рода *Bradyrhizobium* Jordan., в результате которого атмосферный азот может накапливаться в количестве от 4 до 201 кг/га за сезон (Pule-Meulenberg, Dakora, 2015). В Нигерии, стране с самой большой в мире площадью посева вигны, достигающей 4 млн. га (Gómez, 2004), этот показатель составляет от 74 до 117 кг/га (Awonaike et al., 1990). При выращивании одних и тех же сортов в разных условиях доля азота, полученного за счет симбиотической азотфиксации, может варьировать от 30 до 96 % (Dakora et al., 2015), достигая 385 мг/растение за 80 дней роста (Senaratne, Ratnasinghe, 1990). Исследования, проведенные в условиях Южной Африки, Ботсваны и Ганы (Pule-Meulenberg et al., 2010), свидетельствуют, что азотное питание вигны существенно зависит от

симбиотической фиксации атмосферного азота. Нетребовательность вигны к почвенным условиям позволяет выращивать ее на неплодородных почвах с pH = 4,5–9,0, содержанием органического вещества меньше 0,2 % и песка более 85 % (Singh et al., 1997), экономя дорогостоящие минеральные удобрения и пополняя азотный пул почвы для последующих культур. Есть данные, что раса клубеньковых бактерий является специфической для вигны и «другие культуры не заражает» (Павлова, 1959), хотя в последнее время получена информация о широкой специфичности видов ризобий из рода *Bradyrhizobium* Jordan, включающих штаммы, способные к эффективно-му симбиозу не только с вигной, но и большим спектром однолетних и многолетних бобовых растений в тропиках (You et al., 2002). Результаты исследования в Беларуси показали, что лишь 3 из 10 штаммов клубеньковых бактерий сои вида *Bradyrhizobium japonicum* из коллекции ГНУ Институт микробиологии НАН Беларуси показали эффективный симбиоз с вигной (Семенова, 2010).

В Сибири исследования нодуляционной способности и азотфиксации на формах и сортах *Vigna unguiculata* (L.) Walp. при симбиозе с клубеньковыми бактериями не проводили. В то же время удачные попытки выращивания вигны в хозяйствах Алтайского края и других регионов России в открытом грунте и с использованием современных полимерных материалов свидетельствуют о довольно высокой адаптивной способности вида к новым условиям.

Цель работы – выяснить влияние инокуляции тремя штаммами *Bradyrhizobium* sp. на нодуляционную способность, азотфиксацию и продуктивность растений у двух новых сортов вигны.

## Материалы и методы

В работе использовали два сорта вигны *Vigna unguiculata* (L.) Walp.] «Сибирский размер» и «Юньнаньская», созданные в ЦСБС СО РАН (г. Новосибирск). Для инокуляции растений использовали штаммы *Bradyrhizobium* sp. 162 0501, 163 0502 и 164 0503, полученные из коллекции ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии (ФГБНУ ВНИИСХМ), г. Санкт-Петербург. Штаммы были выделены из клубеньков *Vigna unguiculata* в 1960 г. Рекомендованный ВНИИСХМ способ долговременного хранения этих штаммов – на минеральной среде с люпиновой мукой при 4 °С с пересевом каждые 6 мес. и в криоконсервированном состоянии – при –80 °С в жидкой среде с 15 % глицерином. В 1979 г. штаммы были проверены на эффективность в вегетационном опыте ВНИИСХМ и получили оценку «эффективен» (штаммы 162 0501 и 164 0503) и «малоэффективен» (штамм 163 0502). В таблицах и при обсуждении результатов использованы сокращенные обозначения: 162 0501 – «01», 163 0502 – «02» и 164 0503 – «03» соответственно. Штаммы размножали на твердой и жидкой гороховых средах с использованием качалки. Семена инокулировали за 2 часа до посева. Контролем служили семена сортов, обработанные обычной водой (без инокуляции). Исходный почвенный субстрат на основе торфа характеризовался следующим содержанием N-P-K: N-NO<sub>3</sub> – 33,0 мг/л, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> – 72,5 и K<sub>2</sub>O – 122,0 мг/л. В основную заправку почвы в теплице перед началом сезона вносили минеральное удобрение марки N-P-K:



Fig. 1. Cowpea cultivars: (a) Siberisky razmer (Siberian size), (b) Yunnan'skaya (Yunnanese).



Fig. 2. Nodules on cowpea roots (Sibirskiy razmer cv.)

15 : 15 : 15 в дозе 25 г/м<sup>2</sup>, что, по оценке, не превышает дозу, ингибирующую процесс азотфиксации у вигны (Agbenin et al., 1990). Для определения продуктивности горшечную рассаду в возрасте 25–27 дней высаживали в грунт пленочной необогреваемой теплицы ЦСБС СО РАН (55°01' с. ш. 82°56' в. д.) 25 мая. Растения размещали однострочно, с густотой посадки 4,6 раст./м<sup>2</sup>. Площадь учетной делянки – 5,2 м<sup>2</sup>. Определяли общее количество клубеньков, число клубеньков меньше и больше 0,5 см на 35-й день после инокуляции (в стадии 2–3-го настоящего листа), в начале цветения (на 48 день после инокуляции) и в конце вегетационного периода (на 96-й день после инокуляции). Проводили учет количества собранных плодов в биологической спелости (на семена), а также сырой биомассы надземной части растений и корней (г) в конце вегетационного периода. Активность азотфиксации определяли по активности нитрогеназы ацетиленовым методом (нмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> /раст/ч) на газовом хроматографе «Цвет» (Россия) в фазу начала цветения. Использовали стандартные методы обработки опытных данных (Зайцев, 1973). Оценку нодуляции, активности азотфиксации и продуктивности растений проводили в трехкратной повторности. Условные обозначения: М – выборочная средняя, m<sub>М</sub> – средняя ошибка выборочной средней.

## Результаты и обсуждение

По нашим данным, за более чем 10-летний период наблюдений при выращивании форм вигны в открытом и защищенном грунте Сибири клубеньки на ее корнях не образовывались. Это свидетельствует об отсутствии подходящих штаммов ризобий в использованных почвогрунтах. Отметим, что даже в более благоприятных условиях тропической зоны Амазонского региона Бразилии после 3–5 циклов выращивания вигны ее корни без искусственной инокуляции были нодулированы лишь небольшим (< 5 шт./раст.) количеством клубеньков (Neves et al., 1990).

Через 35 дней после инокуляции все использованные штаммы *Bradyrhizobium* sp. проявили вирулентность, т. е. были способны вызывать образование клубеньков (рис. 2) на корнях сортов вигны с показателями от 18,0 ± 1,85 до 23,3 ± 4,24 шт./раст. (сорт Сибирский размер) и от 12,1 ± 3,56 до 35,9 ± 1,73 шт./раст. (сорт Юньнаньская) (табл. 1). Симбиотическая эффективность штамма 02 по признаку «нодуляция» оказалась наиболее выраженной

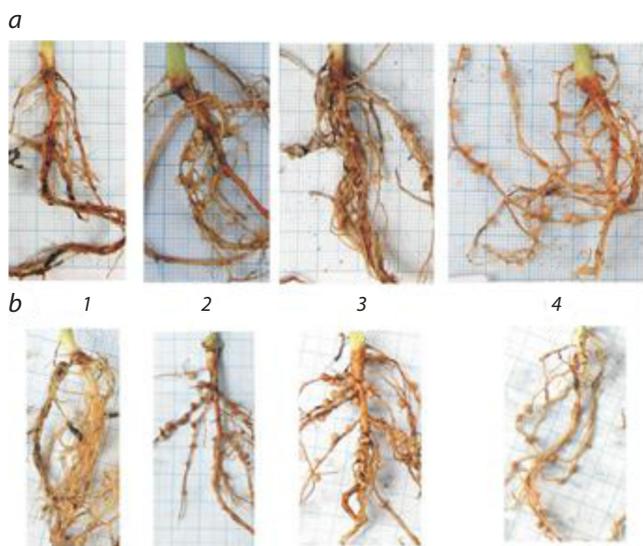
на сорте Юньнаньская, что подтверждает данные других исследований о наличии существенных сортовых различий в проявлении признака (Wang et al., 2012; Омелянюк и др., 2013; Omel'yanuk et al., 2014). Клубеньки интенсивно-розового цвета, формировались преимущественно на растущих молодых корнях, причем как на главном, так и боковых (рис. 3). В отличие от выполненного ранее в Университете штата Оклахома (США) исследования (Kahn, Stoffella, 1991), 70 % доминирования расположения клубеньков преимущественно на главном корне не установлено.

В начале цветения, через 48 дней после инокуляции, средние значения количества клубеньков были максимальными в варианте инокуляции штаммом 02 растений обоих сортов (табл. 1), однако средняя масса клубеньков с растения оказалась больше при использовании штаммов 03 – 0,79 г (сорт Сибирский размер) и 01 – 1,41 г (сорт Юньнаньская). На растениях сорта Сибирский размер, инокулированных штаммом 01, количество клубеньков уменьшилось в 1,8 раза по сравнению с аналогичным показателем на 35-й день после инокуляции (см. табл. 1). Растения сорта Юньнаньская, напротив, показали

**Table 1.** Numbers and weights of nodules of the cowpea cultivars on days 35 and 48 after inoculation

Cultivar	Number of nodules per plant inoculated with <i>Bradyrhizobium</i> strains, nodules/plant						Nodule weight (day 48), g/plant		
	Day 35			Day 48					
	Strain			Strain					
	01	02	03	01	02	03	01	02	03
Sibirskiy razmer	23.3 ± 4.24	22.2 ± 3.31	18.0 ± 1.85	$\frac{13.0 \pm 4.51}{4-17}$	$\frac{30.7 \pm 8.76}{17-47}$	$\frac{26.3 \pm 6.96}{15-39}$	0.25 ± 0.09	0.70 ± 0.02	0.79 ± 0.20
Yunnan'skaya	13.3 ± 3.95	35.9 ± 1.73	12.1 ± 3.56	$\frac{65.0 \pm 26.8}{28-117}$	$\frac{74.0 \pm 22.8}{35-114}$	$\frac{26.3 \pm 4.81}{17-33}$	1.41 ± 0.28	1.32 ± 0.30	0.84 ± 1.19

Numerator:  $M \pm m_M$ . Denominator:  $M_{\min} - M_{\max}$ , where  $M_{\min}$  and  $M_{\max}$  are the minimum and maximum number of nodules, respectively. Control plants had no nodules.

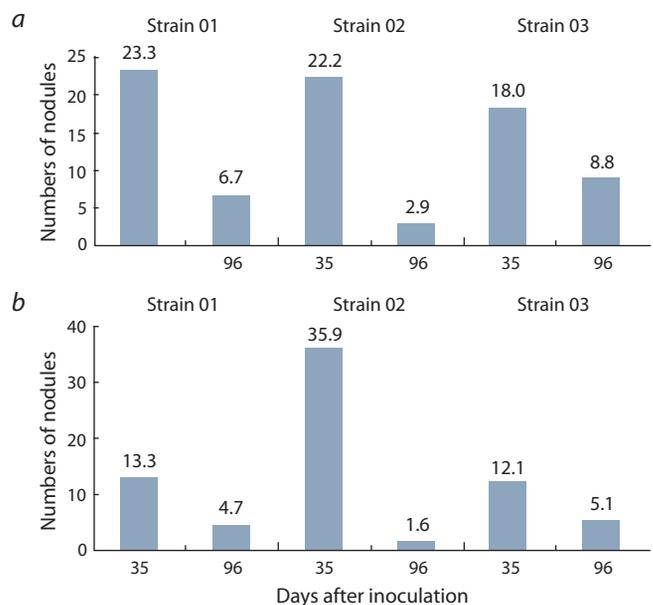


**Fig. 3.** The root system of cowpea cultivars on day 35 after inoculation with *Bradyrhizobium* sp. strains: a, Sibirskiy razmer; b, Yunnan'skaya; 1, control (without inoculation); 2, strain 01; 3, strain 02; 4, strain 03.

последовательное увеличение нодуляции при инокуляции штаммами 01, 02 и 03 в 4,9, 2,1 и 2,2 раза, соответственно, также в сравнении с данными на 35-й день. Результаты, полученные по массе клубеньков к началу цветения, близки к данным (0,37–1,70 г/раст.) В.А. Kahn и P.J. Stoffella (1991), проводивших опыты на трех сортах в открытом грунте штатов Флорида и Оклахома (США).

К концу вегетационного периода, через 96 дней после инокуляции, наибольшее снижение числа клубеньков наблюдали при использовании штамма 02 (на сорте Сибирский размер – в 7,7 раза и на сорте Юньнаньская – в 22,4 раза) относительно количества клубеньков на 35-й день после инокуляции (рис. 4).

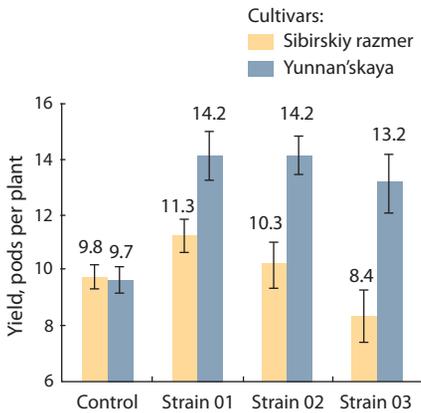
Наименьшее снижение нодуляции было отмечено на сорте Сибирский размер при использовании штамма 03 (в 2 раза), а на сорте Юньнаньская – при использовании штаммов 03 (в 2,4 раза) и 01 (в 2,8 раза) также по сравнению с уровнем нодуляции на 35-й день после



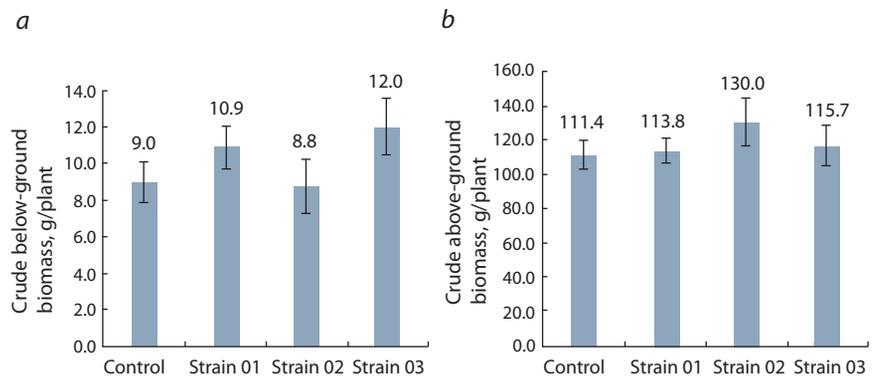
**Fig. 4.** Numbers of nodules on cowpea roots on days 35 and 96 after inoculation: (a) Sibirskiy razmer, (b) Yunnan'skaya.

инокуляции. Уменьшение числа клубеньков к концу вегетации, вероятно, связано с процессом их естественного старения, запускающимся после цветения. Сохранение большего количества клубеньков к концу сезона при использовании штаммов 03 и 01 является важным признаком эффективной нодуляции, так как происходящая при старении клубеньков деградация белка позволяет повторно утилизировать азот и другие вещества, а цистеиновые протеазы клубеньков принимают участие в адаптации клеток хозяина к физиологическим стрессам (Серова, Цыганов, 2014).

При оценке семенной продуктивности растений вигны, инокулированных разными штаммами ризобий, выявлена ее сортовая специфичность. В контроле, без инокуляции, у обоих сортов было одинаковое значение урожая плодов (9,8 и 9,7 шт./раст.) (рис. 5). При инокуляции разными штаммами сорт Сибирский размер характеризовался либо небольшим увеличением урожая до 11,3 шт./раст.



**Fig. 5.** Pod yield from two cowpea varieties inoculated with various *Bradyrhizobium* strains.



**Fig. 6.** Accumulation of crude below (a)- and above-ground biomass (b) in Sibirskiy razmer cowpea inoculated with various *Bradyrhizobium* strains.

**Table 2.** Nitrogen fixation rates in cowpea cultivars Sibirskiy razmer and Yunnan'skaya inoculated with strains of *Bradyrhizobium* sp.

Cultivar	Nitrogenase activity in plants inoculated with the corresponding strain, nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /plant/h		
	strain 01	strain 02	strain 03
Sibirskiy razmer	$\frac{2499.6 \pm 1393.0}{853.3 - 5269.1}$	$\frac{3397.0 \pm 1514.4}{1283.2 - 6332.6}$	$\frac{5155.3 \pm 878.8}{3817.5 - 6811.4}$
Yunnan'skaya	$\frac{5255.5 \pm 2036.2}{1203.0 - 7630.2}$	$\frac{4516.1 \pm 1148.7}{2258.4 - 6013.4}$	$\frac{4673.0 \pm 719.0}{3252.9 - 5578.7}$

Numerator:  $M \pm m_M$ . Denominator:  $M_{\min} - M_{\max}$ , where  $M_{\min}$  and  $M_{\max}$  are the minimum and maximum nitrogenase activities, respectively. Control plants showed no nitrogen fixation.

(штамм 01), либо отсутствием эффекта от инокуляции (штаммы 02 и 03). Сорт Юньнаньская характеризовался более высокой семенной продуктивностью (13,2–14,2 шт./раст.) в вариантах инокуляции всеми анализируемыми штаммами (рис. 5). Полученные результаты могут быть обусловлены генотипическими различиями у анализируемых сортов вигны.

При сравнении с соей (сорт Киевская 27) в условиях Украины все использованные штаммы вида *Bradyrhizobium japonicum* показали однозначно положительное влияние на урожайность растений (от 7 до 38 % по отношению к контролю), хотя характеризовались отсутствием прямой связи между количеством, массой клубеньков, азотфиксирующей активностью и урожайностью (Драгозов и др., 2011).

В конце вегетации наибольшая сырая биомасса корней вигны сорта Сибирский размер отмечена при использовании штамма 03 –  $12,0 \pm 1,58$  г (контроль –  $9,0 \pm 1,16$  г) (рис. 6). Показатели сырой биомассы остальных вариантов опыта (штаммы 01 и 02) оказались в пределах ошибки выборочной средней контроля (без инокуляции).

Более высокий показатель накопления сырой биомассы надземной части растений у сорта Сибирский размер отмечен при использовании штамма 02 – 130,0 г/раст., почти одинаковые значения (в пределах ошибки выборочной средней) – с применением штаммов 01 – 113,8 и 03 – 115,7 г/раст., в контроле – 111,4 г/раст.

Данные оценки активности азотфиксации показали активность нитрогеназы разных штаммов у сорта Сибирский размер от 853,3 до 6811,4 нмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/раст./ч, сорта Юньнаньская – от 1203,0 до 7630,2 нмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/раст./ч (табл. 2). Активность нитрогеназы, достигнутая при использовании разных штаммов, на сорте Сибирский размер варьирует от 853,3 до 6811,4 нмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/раст./ч, на сорте Юньнаньская – от 1203,0 до 7630,2 нмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/раст./ч. Высокие значения этого показателя отмечены у сорта Сибирский размер при использовании штамма 03 ( $5155,3 \pm 878,8$  нмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/раст./ч); сорта Юньнаньская – штаммов 01 ( $5255,5 \pm 2036,2$  нмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/раст./ч), а также 03 ( $4673,0 \pm 719,0$  нмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/раст./ч). В контроле (без инокуляции) активность азотфиксации была равна нулю.

Проведенные эксперименты показали достаточно высокие значения активности нитрогеназы на сортах вигны в Сибири в сравнении с данными, полученными в США при выращивании растений пяти сортов в сосудах и инокуляции эффективными штаммами USDA61 и USDA74: от  $1,40 \pm 0,45$  до  $8,1 \pm 4,13$  мкмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/раст./ч (Keyser et al., 1982).

Анализ сопряженностей показал довольно тесную корреляционную связь между активностью азотфиксации и массой клубеньков (шт./раст.):  $r = 0,78$  ( $p > 0,95$ ), слабее – между азотфиксацией и общим количеством клубеньков:  $r = 0,540$  ( $p < 0,95$ ). Между активностью азотфиксации и количеством клубеньков больше 0,5 см за-

висимость слабая ( $r = 0,061, p < 0,95$ ). Схожие результаты прямой зависимости азотфиксации от массы и количества клубеньков при инокуляции вигны четырьмя штаммами *B. japonicum* были получены в Институте сельскохозяйственной микробиологии НААН Украины (Крутило, 2010), но степень корреляции этих признаков была ниже (по приведенным табличным данным,  $r = 0,47$  и  $0,38$  соответственно). На положительную связь между азотфиксацией и количеством клубеньков указывают также авторы исследования, проведенного в Танзании (Marandu et al., 2010). Экспериментами в условиях теплицы (Wadisirisuk, Weaver, 1985) было показано, что количество бактериоидов в клубеньках возрастает с увеличением массы клубенька. В то же время авторы указывают на отсутствие стабильно тесной зависимости между активностью азотфиксации и количеством бактериоидов в клубеньках: в одном эксперименте коэффициент регрессии был  $0,93$ , в другом –  $0,65$ . На то, что количество клубеньков не всегда коррелирует с показателем активности азотфиксации, указывают и данные, полученные на горохе (Омельянюк и др., 2013; Omel'yanuk et al., 2014). Вероятно, функциональное состояние клубенька при достижении им оптимального для протекания комплекса биохимических процессов размера определяет эффективность азотфиксации, а не его физический размер.

Таким образом, впервые для агроклиматических условий Сибири созданы эффективные симбиотические системы на основе двух новых сортов вигны, Сибирский размер и Юньнаньская, и двух штаммов клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium* sp., у которых уровни нодуляционной способности и активности азотфиксации оказались сопоставимы с аналогичными показателями в традиционных районах ее производства (страны Африки, Бразилия, США). Установлены различия между двумя сортами по урожаю плодов при инокуляции растений ризобиями. Для полного использования потенциала симбиотической азотфиксации с учетом высокой нитрогеназной активности и сохранения большего количества клубеньков к концу сезона для инокуляции вигны сортов Сибирский размер и Юньнаньская целесообразно использовать штаммы 162 0501 и 164 0503. В дальнейшем в популяциях вигны необходимо выявить формы с более активной нодуляцией и азотфиксацией, определить генетический контроль этих признаков, а также изучить условия использования этих и других штаммов (температура, pH почвы), взаимодействие с микопатогенами, вызывающими заболевание корней, а также дозы и формы применения макро- и микроэлементов.

### Acknowledgments

The authors are grateful to researchers of the Institute of Cytology and Genetics M.N. Glyanenko and T.M. Mishchenko and researchers of the Central Siberian Botanical Garden N.Ya. Gordienko and A.A. Erst for assistance in experiments.

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0005.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

- Agbenin J.O., Lombin G., Owonubi J.J. Effect of boron and nitrogen fertilization on cowpea nodulation, mineral nutrition and grain yield. *Fertilizer Res.* 1990;22(2):71-78.
- Awonaike K.O., Kumarasinghe K.S., Danso S.K.A. Nitrogen fixation and yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) as influenced by cultivar and *Bradyrhizobium* strain. *Field Crops Res.* 1990;24(3-4):163-171.
- Dakora F.D., Belane A.K., Mohale K.C., Makhubkdu T.I., Makhura P., Pule-Meulenberg F., Mapope N., Mogkelhe S.N., Gyoglluu C., Phatlane G.P., Muhaba S., Mokobane F., Oteng-Frimpong R. Food Grain Legumes: Their Contribution to Soil Fertility, Food Security and Human Nutrition/Health in Africa. *Biological Nitrogen Fixation*. Eds F.J. de Bruijn. John Wiley and Sons, Inc., 2015;2(Ch. 105): 1063-1070.
- Dragovoz I.V., Leonova N.O., Iutinskaya G.A. The synthesis of phytohormones by strains of *Bradyrhizobium japonicum* with different symbiotic efficiencies. *Mikrobiol. Zhurn.* = *Microbiology Journal.* 2011;73(4):29-35.
- Fotev Yu.V., Belousova V.P. Cowpea. *Introduktsiya netraditsionnykh plodovnykh, yagodnykh i ovoshchnykh rasteniy v Zapadnoy Sibiri*. *Otv. red. I.Yu. Koropachinskiy, A.B. Gorbunov* [The Introduction of Nontraditional Fruit, Berry, and Vegetable Plants in West Siberia]. Eds I.Yu. Koropachinskiy, A.B. Gorbunov]. Novosibirsk, Geo Publ., 2013.
- Fotev Yu.V., Kudryavtseva G.A., Belousova V.P. Biological features and productivity of cow pea under conditions of Siberia. *Sibirskiy Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki* = *Siberian Herald of Agricultural Sciences.* 2007;4:32-36.
- Gómez C. Cowpea: Post-Harvest Operations. Ed. D. Mejía. FAO, Rome (Italy). 2004.
- Gosudarstvennyy reestr selektsionnykh dostizheniy, dopushchennykh k ispolzovaniyu (po sostoyaniyu na 09.04.2015 g.) [State Register of Breeding Achievements Approved for Usage as of April 09, 2015]. Available at: [http://www.gossort.com/ree\\_cont.html](http://www.gossort.com/ree_cont.html) (accessed August 20, 2015).
- Kahn B.A., Stoffella P.J. Nodule distribution among root morphological components of field-grown cowpeas. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1991;116(4):655-658.
- Keyser H.H., Berkum P.V., Weber D.F. A comparative study of the physiology of symbioses formed by *Rhizobium japonicum* with *Glycine max*, *Vigna unguiculata*, and *Macroptilium atropurpureum*. *Plant Physiol.* 1982;70:1626-1630.
- Krutylko D.F. Funktsionuvannya simbiotichnoyi sistemi vigna kitayska – bulbochkovi bakterii [The functioning of symbiotic system: cowpea – nodule bacteria]. *Silskogospodarska mikrobiologiya: mizhvidomchiy tematichniy naukoviy zbirnik* [Agricultural Microbiology: Interdepartmental Thematic Collection of Scientific Articles]. Chernigov, TsNP Publ. 2010;12:46-58.
- Marandu A.E.T., Semu E., Mrema J.P., Nyaki A.S. Quantification of atmospheric N<sub>2</sub> fixed by cowpea, pigeonpea and greengram grown on Ferralsols in Muheza District, Tanzania. *Tanzania J. Agric. Sci.* 2010;10(1):28-37.
- Naumova N.B., Fotev Yu.V., Bugrovskaya G.A., Belousova V.P. Macro- and micronutrient composition of greenhouse-grown cowpea, kiwano, bitter melon and wax gourd. *Ovoshchi Rossii* = *Vegetables of Russia.* 2014;3(24):11-17.
- Neves M.C.P., Ramos M.L.G., Martinazzo A.F., Botelho G.R., Doberiner J. Adaptation of more efficient soybean and cowpea rhizobia to replace established populations. *Biological nitrogen fixation and sustainability of tropical agriculture: Proc. of the 4<sup>th</sup> Intern. Conf. of the African Association for Biological Nitrogen Fixation (AABNF)*, Int. Inst. Tropical Agric., Nigeria. Sept. 24–28, 1990:219-233.
- Omel'yanuk L.V., Sidorova K.K., Shumny V.K. Study of nodulation and nitrogen fixation in introduced cultivars and candidate lines of pea (*Pisum sativum* L.) grown at two nitrogenous nutrition levels. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2013;17(3):424-429.

- Omel'yanuk L.V., Sidorova K.K., Shumny V.K. Study of nodulation and nitrogen fixation in introduced cultivars and candidate lines of pea (*Pisum sativum* L.) grown at two nitrogenous nutrition levels. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2014;4(1):19-22.
- Pavlova A.M. The value of black-eyed cowpea for breeding. Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 1959;32(3):228-232.
- Piennar B.J., van Wyk A.E. The *Vigna unguiculata* complex (Fabaceae) in South Africa. South Afr. J. Bot. 1992;58:414.
- Pule-Meulenberg F., Alphonsus K., Belane A.K., Krasova-Wade T., Dakora F.D. Symbiotic functioning and bradyrhizobial biodiversity of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in Africa. BMC Microbiol. 2010;10:1-12. DOI 10.1186/1471-2180-10-89
- Pule-Meulenberg, F., Dakora, F.D. Nodule Functioning and Symbiotic Efficiency of Cowpea and Soybean Varieties in Africa. Biological Nitrogen Fixation. Ed. F.J. de Bruijn. John Wiley and Sons, Inc, Hoboken, NJ (USA). 2015;2:1025-1030. DOI 10.1002/9781119053095.ch100
- Semenova I.V. Study of the capacity of *Bradyrhizobium japonicum* strains for symbiosis with *Vigna unguiculata*. Tezisy докладov VI Molodezhnoy shkoly-konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem «Aktualnye aspekty sovremennoy mikrobiologii», 25–27 oktyabrya 2010 g. [Abstracts from the 6th International Youth School-Conference “Current issues of modern microbiology”, October 25–27, 2010]. Moscow, 2010.
- Senaratne R., Ratnasinghe D.S. Ontogenic variation in nitrogen fixation and accumulation of nitrogen in mungbean, blackgram, cowpea, and groundnut. Biology Fert. Soils. 1993;16(2):125-130.
- Serova T.A., Tsyganov V.E. Symbiotic nodule senescence in legumes: molecular-genetic and cellular aspects (review). Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2014;5:3-15.
- Singh B.B. Cowpea: the food legume of the 21st century. Madison, WI., USA. 2014. DOI 10.2135/2014.cowpea URL: <http://dx.doi.org/10.2135/2014.cowpea>
- Singh B.B., Chambliss O.L., Sharma B. Recent advances in cowpea breeding. Advances in cowpea research. Eds B.B. Singh, D.R. Mohan, K.E. Dashiell, L.E.N. Jackai. Copublication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS). IITA. Ibadan, Nigeria. 1997:30-49.
- Vishnyakova M.A., Aleksandrova T.G., Buravtseva T.V., Bulyn-tsev S.V., Burlyaeva M.O., Egorova G.P., Semenova E.V., Seferova I.V., Yankov I.I. Strategy and tactics of the mobilization of grain legume genetic resources in the collection of the All-Russia Plant Breeding Institute at the turn of the century. Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 2012;169:41-52.
- Wadisirisuk P., Weaver R.W. Importance of bacteroid number in nodules and effective nodule mass to dinitrogen fixation by cowpeas. Plant Soil. 1985;87(2):223-231.
- Wang D., Yang S., Tang F., Hongyan Zhu H. Symbiosis specificity in the legume – rhizobial mutualism. Cell. Microbiol. 2012;14(3):334-342. DOI 10.1111/j.1462-5822.2011.01736.x
- You Z., Marutani M., Borthakur D. Diversity among *Bradyrhizobium* isolates nodulating yardlong bean and sunnhemp in Guam. J. Appl. Microbiol. 2002;93(4):577-584. DOI 10.1046/j.1365-2672.2002.01733.x
- Zaitsev G.N. Metodika biometricheskikh raschetov [Methods of Biometric Calculations]. Moscow, Nauka, 1973.