
СИМБИОТИЧЕСКАЯ АЗОТФИКСАЦИЯ КАК ФАКТОР ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ И ПЛОДОРОДИЯ ПОЧВЫ

О.Г. Волобуева

Российский государственный аграрный университет
МСХА им. К.А. Тимирязева
ул. Тимирязевская, 49, Москва, Россия, 127550

Показана возможность повышения симбиотической азотфиксации при использовании био-препаратов как фактора экологической безопасности и плодородия почвы. Прослежена динамика эндогенных гормонов бобовых растений, обработанных биопрепаратами альбит и ризоторфин. Установлена корреляция между содержанием отдельных фитогормонов в вегетативных органах бобовых растений и нитрогеназной активностью.

Ключевые слова: симбиотическая азотфиксация, фитогормоны, ризобии, ризобактерии, био-препараты, нитрогеназная активность.

Симбиотическая азотфиксация представляет собой сложную экологическую систему, которая характеризуется прогрессивной морфологической специализацией и развитием более тесных отношений между макросимбионтом (растением) и микросимбионтом (ризобиями). Способность к взаимодействию с микроорганизмами, выполняющими трофические или защитные функции, — фундаментальное свойство растений, которое определяет его возможность адаптироваться к широкому спектру биотических и абиотических факторов среды [1]. Вступая в тесные сигнальные взаимодействия с растениями и вызывая у них развитие специальных структур, ризобии обеспечивают азотное питание бобовых, что определило их широкое хозяйственное использование. Развитие бобово-ризобияльного симбиоза представляет собой совокупность двух процессов — построения компартментов, содержащих клетки ризобий (межклеточные инфекционные нити, внутриклеточные симбиосомы), и органогенеза клубенька [2]. Клубенок является уникальной экологической нишей для ризобий, которые обеспечивают эффективное снабжение микросимбионта энергией и ассимиляцию продуктов азотфиксации. Изучение симбиотической азотфиксации имеет большое практическое значение, поскольку азот, зафиксированный в клубеньках бобовых, играет важную роль в азотном балансе естественных экосистем и агроценозов.

Современное сельское хозяйство заинтересовано в производстве экологически чистой продукции с наименьшими затратами и минимальным риском для окружающей среды. Поэтому одним из приоритетных направлений развития земледелия становится концепция устойчивого сельского хозяйства, которая базируется на альтернативных, экологически безопасных системах землепользования, способных наиболее эффективно использовать невозобновляемые и внутривладельческие ресурсы, биологические циклы и улучшить качество жизни сельхозпроизводителей и всего общества в целом. Отечественное земледелие, функционирующее в условиях резкого сокращения внесения минеральных удобрений, весьма

заинтересовано в использовании альтернативных агротехнологий, позволяющих получить дополнительные источники минерального питания растений. Это может быть достигнуто в результате применения биопрепаратов, повышающих симбиотическую азотфиксацию и улучшающих усвоение других макроэлементов бобовыми растениями, что является экологически безопасным и экономически эффективным приемом при условии научно обоснованного использования [3; 4]

Применение биопрепаратов на горохе, созданных на основе природных компонентов, способствует улучшению экологической обстановки за счет снижения использования высокотоксичных и дорогостоящих химических средств защиты, исключаяющих их негативные воздействия на окружающую среду, человека и животных, полезных организмов [5].

Взаимодействие растений с симбиотическими и полезными ризосферными микроорганизмами играет важную роль в развитии растений, обеспечивая их соответствующим питанием и фитогормонами, защищая от патогенных микроорганизмов, адаптируя к стрессам. Активность почвенной микрофлоры во многом определяет качественные характеристики пахотного горизонта. К сожалению, в настоящее время сельские товаропроизводители недостаточно осведомлены о перспективах использования и возможностях современных микробиологических удобрений и биопрепаратов. Тем не менее в последнее время отмечается интерес к микробиологическим препаратам. Это связано с изменением подхода к проблеме выращивания экологически безопасной сельскохозяйственной продукции и постепенной переориентации АПК на экологически ориентированное земледелие. Применение биопрепаратов на основе азотфиксирующих бактерий позволяет направленно регулировать численность и активность полезной микрофлоры в ризосфере возделываемых растений, улучшить обеспеченность растений доступным азотом и за счет этого повысить продуктивность возделывания культур и качество сельскохозяйственной продукции.

Цель исследования — изучить влияние биопрепаратов ризоторфина и альбита на содержание и соотношение фитогормонов в листьях, стеблях и корнях с клубеньками у бобовых растений и эффективность симбиоза.

Методика работы. Исследования проведены в условиях мелкоделяночного опыта с растениями гороха сортов Норд и Мультик и в условиях полевого опыта с растениями фасоли сортов Гелиада и Шоколадница. Семена замачивали в течение 3 ч. в растворе биопрепарата альбит в концентрации 10^{-6} М и затем за 1 ч. перед посевом обрабатывали ризоторфином, штамм *Rhizobium leguminosarum 245a* (для гороха) и штамм *Rhizobium phaseoli 700* (для фасоли). Схема опыта: вариант 1 — контроль (без обработки); вариант 2 — семена обработаны ризоторфином; вариант 3 — семена обработаны альбитом. Ризоторфин (штаммы 245а, 700) получен из ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии (Санкт-Петербург). Биопрепарат альбит разработан в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (Пушино) совместно с научно-производственной фирмой ООО «Альбит». В основе — почвенные ризосферные бактерии *Bacillus megaterium* и *Pseudomonas aureofaciens*, стимулирующие рост растений и повышающие их устойчивость к болезням и неблагоприятным факторам среды. Содержание фи-

тогормонов (ИУК — индолилуксусная кислота, ЦК — цитокинины, АБК — абсцизовая кислота) в листьях, стеблях, корнях с клубеньками определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) по методике, разработанной в лаборатории регуляторов роста и развития сельскохозяйственных растений РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева [6]. Биологическую активность ГК (гибберелловая кислота) определяли по росту гипокотилей салата сорта Берлинский. Содержание ГК — по калибровочной кривой, для построения которой использовали гибберелловую кислоту. Условия хроматографирования для определения фитогормонов в растения гороха и фасоли изложены ранее [7; 8]. Ошибка методов определения содержания фитогормонов не превышала 20%. В процессе вегетации проводили фенологические наблюдения за динамикой роста и развития растений, учитывали массу и количество клубеньков. Активность нитрогеназы в клубеньках определяли на газовом хроматографе «Цвет-106» [9]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica for Microsoft Windows.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований установлена тенденция увеличения содержания ИУК в листьях гороха сорта Норд при обработке биопрепаратами. У растений сорта Мультик при тех же условиях наблюдалось увеличение ИУК при обработке ризоторфином и почти вдвое при обработке альбитом (табл. 1).

Таблица 1

Содержание фитогормонов в вегетативных органах растений гороха при обработке биопрепаратами (нг/г сухой массы)

| Вариант | Вегетативные органы | Фитогормоны | | | |
|------------|---------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| | | ИУК | ЦК | ГК | АБК |
| Контроль | Листья | <u>23,4</u> | <u>380</u> | <u>987</u> | — |
| | | <u>23,5</u> | <u>1050</u> | <u>350</u> | |
| | Стебли | <u>22,9</u> <u>23</u> | <u>97</u> <u>817</u> | <u>1400</u> <u>2050</u> | <u>30,5</u> <u>31</u> |
| Ризоторфин | Листья | <u>26,5</u> | <u>450</u> | <u>1003</u> | — |
| | | <u>26,8</u> | <u>1320</u> | <u>1457</u> | |
| | Стебли | <u>26,2</u> <u>26,6</u> | <u>99,5</u> <u>991</u> | <u>2001</u> <u>2007</u> | <u>34,4</u> <u>35</u> |
| Альбит | Листья | <u>53</u> | <u>6600</u> | <u>536</u> | <u>33,5</u> |
| | | <u>39,7</u> | <u>4500</u> | <u>2422</u> | <u>34,6</u> |
| | Стебли | <u>26,5</u> <u>40</u> | <u>1980</u> <u>3966</u> | <u>460</u> <u>1488</u> | <u>34</u> <u>68,7</u> |
| Мультик | Листья | <u>39,8</u> | <u>3960</u> | <u>1038</u> | <u>34,8</u> |
| | | <u>53,2</u> | <u>3465</u> | <u>1800</u> | <u>51,6</u> |
| | Стебли | <u>26,5</u> <u>40</u> | <u>1980</u> <u>3966</u> | <u>460</u> <u>1488</u> | <u>34</u> <u>68,7</u> |
| Корни | Листья | <u>26</u> | <u>336</u> | <u>1176</u> | — |
| | | <u>52,9</u> | <u>995</u> | <u>1799</u> | <u>33,9</u> |
| | Стебли | <u>26,5</u> <u>40</u> | <u>1980</u> <u>3966</u> | <u>460</u> <u>1488</u> | <u>34</u> <u>68,7</u> |
| Корни | Листья | <u>39,8</u> | <u>3960</u> | <u>1038</u> | <u>34,8</u> |
| | | <u>53,2</u> | <u>3465</u> | <u>1800</u> | <u>51,6</u> |
| | Стебли | <u>26,5</u> <u>40</u> | <u>1980</u> <u>3966</u> | <u>460</u> <u>1488</u> | <u>34</u> <u>68,7</u> |

Примечания. 1. Над чертой — Норд, под чертой — Мультик.
2. Прочерк здесь и в табл. 2 — содержание гормона ниже уровня, регистрируемого хроматографом.

Такая же закономерность отмечена для ИУК в стеблях. Содержание ИУК в листьях растений фасоли сортов Гелиада и Шоколадница при обработке биопрепаратами колебалось в пределах 5,3—5,7 нг/г сырой массы (табл. 2).

Таблица 2

**Содержание фитогормонов в растениях фасоли
при обработке биопрепаратами (нг/г сырой массы)**

| Вариант | Вегетативные органы | Фитогормоны | | | |
|------------|---------------------|-------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | ИУК | ЦК | ГК | АБК |
| Контроль | Листья | <u>4,8</u> | <u>100</u> | <u>6,4</u> | <u>15,8</u> |
| | | 5,2 | 117 | 3,8 | 10,5 |
| | Стебли | — | <u>111</u> <u>190</u> | <u>11,8</u> — | <u>3,0</u> <u>12,9</u> |
| Ризоторфин | Листья | <u>13,1</u> | <u>29</u> | <u>28</u> | <u>30,1</u> |
| | | 12,9 | 119 | 3,8 | 12,4 |
| | Стебли | — | <u>275</u> <u>450</u> | <u>13,2</u> <u>4,8</u> | <u>3,4</u> <u>6,9</u> |
| Альбит | Листья | <u>13,2</u> | <u>31</u> | <u>21,1</u> | <u>20,6</u> |
| | | 13,2 | 217 | 4,8 | 10,3 |
| | Стебли | — | <u>117</u> <u>62</u> | <u>1613</u> — | <u>3,5</u> <u>3,5</u> |
| Альбит | Листья | <u>6,4</u> | <u>189</u> | <u>6,9</u> | <u>10,4</u> |
| | | 20,1 | 39 | 14,9 | — |
| | Стебли | — | <u>117</u> <u>62</u> | <u>1613</u> — | <u>3,5</u> <u>3,5</u> |

Примечание. Над чертой — Гелиада, под чертой — Шоколадница.

У растений гороха сорта Норд обработка биопрепаратами уменьшала уровень ИУК в корнях с клубеньками, но увеличивала у сорта Мультик. Содержание ИУК в корнях с клубеньками у сорта фасоли Гелиада под влиянием альбита снижалось почти в два раза. Обработка биопрепаратами приводила к увеличению содержания ИУК в корнях с клубеньками у растений сорта Шоколадница. Очевидно, в этом случае проявились сортовые особенности растений. Возможно, это связано с конкуренцией клубеньковых бактерий и бактерий, входящих в состав биопрепарата альбит, за метаболиты.

Содержания ИУК в корнях с клубеньками растений фасоли сортов Гелиада и Шоколадница увеличивалось по сравнению с уровнем ИУК в листьях (см. табл. 2). Вероятно, это связано с тем, что сами клубеньковые бактерии активно участвуют в синтезе ИУК. Ауксины ризобий в дополнении к ауксином растений меняют ритмику клеточного деления. С действием ауксинов связано удаление кальция из клеточной оболочки, которое влечет за собой увеличение пластичности и способности ее к растяжению. Существенная функция этого соединения связана в значительной степени с его способностью при местном повышении содержания вызывать приток и перераспределение пластических веществ, необходимых для осуществления интенсивного нарастания ткани. Установлено, что ИУК активизи-

рует сукцинатдегидрогеназу, стимулирует превращение лимонной кислоты в янтарную, фумаровую и яблочную, а эти кислоты совместно с ИУК играют особую роль в усилении и ускорении роста [10]. В литературе имеются данные, что ауксин, содержащийся в корнях, является как продуктом собственного синтеза, так и результатом притока из надземной части макросимбионта [11; 12]. Поэтому можно полагать, что часть ИУК транспортировалась из листьев в корни.

Ауксины, кроме функции регуляции роста, необходимы также для реализации активности цитокининов. Цитокинины стимулируют образование клубеньков у растений под влиянием *Agrobacterium tumefaciens* [13]. Известно, что высоковирулентные штаммы *Rhizobium* обладают повышенной способностью продуцировать цитокинины, и именно им отводится важная роль в формировании клубенька [14]. Цитокинины повышают аттрагирующую способность клеток макросимбионта, что обусловлено их влиянием на функциональную активность клеточных мембран [15].

Наибольшее содержание ЦК (см. табл. 1) у растений гороха обоих сортов при обработке биопрепаратами наблюдалось в корнях с клубеньками. Этот факт подтверждает, что основным местом синтеза ЦК служат апикальные меристемы корней, влияющие на развитие побега и прежде всего на функционирование ассимиляционного аппарата. Возможно также, что наибольшее содержание ЦК в корнях с клубеньками связано с тем, что некоторые бактерии, ассоциированные с растениями, способны синтезировать большие количества фитогормонов, в том числе цитокининов.

У растений фасоли сорта Гелиада увеличение содержания ЦК наблюдалось в корнях с клубеньками и в листьях при обработке биопрепаратами. У сорта Шоколадница обработка альбитом способствовала снижению содержания цитокининов во всех органах растения (табл. 2).

В листьях растений гороха сорта Норд при обработке биопрепаратами выявлена тенденция увеличения ГК, а у сорта Мультик в аналогичных вариантах ГК возрастало почти в 3 раза (табл. 1). Альбит снижал содержание ГК в стеблях растений сорта Норд и в меньшей степени — сорта Мультик. Содержание ГК в корнях с клубеньками растений гороха обоих сортов при обработке биопрепаратами увеличивалось.

У растений фасоли сорта Гелиада при обработке альбитом содержание ГК выше в листьях и стеблях и ниже в корнях с клубеньками. Обработка альбитом растений сорта Шоколадница снижала содержание ГК в листьях и стеблях и повышала в корнях с клубеньками (см. табл. 2).

Гиббереллины в отличие от ауксинов и ЦК в меньшей степени дезорганизуют деятельность меристемы, хотя и усиливают митотическую активность. Обычно ГК способствуют увеличению количества эндогенных ауксинов в растениях, под влиянием ГК усиливается также синтез белка и действие ЦК. Гиббереллины стимулируют удлинение побегов, но очень слабо или совсем не влияют на рост корней. Молекулярные механизмы действия гиббереллинов, их структурные особенности и функциональное действие свидетельствуют о том, что они не только синтезируются во многих органах растений, но могут также передвигаться в растениях в акро- и базипетальном направлениях [16].

Показано, что содержание АБК в листьях растений гороха обоих сортов было низким, но у сорта Мультик при обработке биопрепаратами оно увеличивалось в стеблях и корнях. Содержание АБК у фасоли сорта Гелиада под влиянием альбита повышалось в листьях, не изменялось в стеблях и уменьшалось в корнях с клубеньками. У сорта фасоли Шоколадница при обработке биопрепаратами содержание АБК в листьях не менялось, но уменьшалось в стеблях и в корнях с клубеньками.

Обычно АБК, ингибитор роста, играющий ведущую роль в регулировании покоя, тормозит ростовые процессы в растении. Торможение роста сопровождается подавлением синтетических процессов и ускорением старения тканей. АБК выступает антагонистом ИУК, ЦК и ГК, его называют стрессовым гормоном, поскольку при неблагоприятных условиях внешней среды его концентрация сильно меняется.

Анализ результатов исследования по изучению азотфиксирующей активности выявил сортовую реакцию на действие биопрепаратов. Наибольшей отзывчивостью характеризовался сорт Гелиада. Ризоторфин и альбит повышали нитрогеназную активность растений этого сорта на фоне увеличения ЦК в листьях и корнях с клубеньками, снижения ИУК, ГК и АБК в корнях с клубеньками и повышения ГК и АБК в листьях и стеблях.

У сорта фасоли Шоколадница обработка ризоторфином увеличивала азотфиксирующей активности растений по сравнению с контролем. Это наблюдалось на фоне повышения ГК в листьях и стеблях, АБК — в стеблях и корнях с клубеньками, ЦК — в листьях, стеблях и корнях с клубеньками и снижения ГК и ИУК в корнях с клубеньками. Биопрепарат альбит снижал симбиотическую активность растений фасоли сорта Шоколадница (рис.).

Активность нитрогеназы,
мкгN/раст/ч.

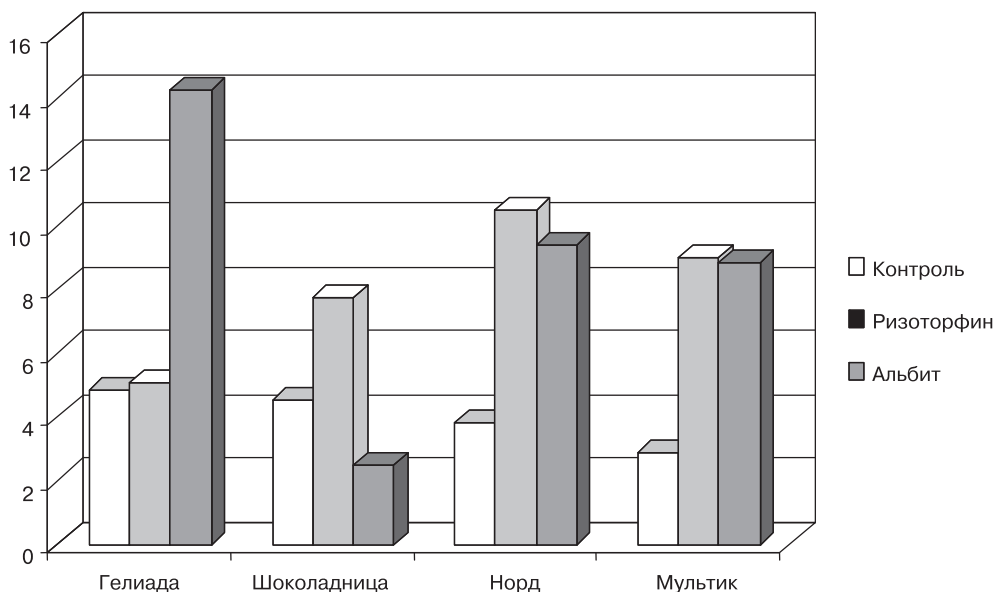


Рис. Влияние биопрепаратов на активность нитрогеназы бобовых растений

Обработка биопрепаратами растений гороха обоих сортов повышала их азотфиксирующую активность в корнях с клубеньками. Наибольшая активность нитрогеназы наблюдалась в корнях с клубеньками растений гороха сорта Норд. В большей степени симбиотическая активность отмечена при обработке ризоторфином. Увеличение азотфиксирующей активности растений гороха при обработке биопрепаратами наблюдалась на фоне увеличения цитокининов в корнях с клубеньками.

Вероятно, нитрогеназа служит мишенью для разнообразных регуляторных воздействий. Для действия нитрогеназы необходима энергия, освобождающаяся при гидролизе АТФ. Биосинтез нитрогеназы, а также снабжение ее восстановителем и энергией требуют значительных метаболических затрат, что может находиться под контролем фитогормонов.

Важно также обратить внимание и на эффект ризобактерий альбита, возможно оказывающих влияние на метаболизм клубеньковых бактерий. Кроме того, вероятно связь с видоизменениями органогенеза у растений с процессами пролиферации и дифференциации в них, так как под воздействием соответствующих возбудителей (в нашем случае ризобий и ризобактерий) у растений создается особая патогенная ситуация, характеризующаяся изменениями клеток и тканей, в свою очередь, приводящих к морфологическим преобразованиям органов растения-хозяина.

В результате проведенных исследований показано, что обработка растений гороха и фасоли разных сортов экологически чистыми, совершенно безвредными биопрепаратами, содержащими бактерии, определяющими почвенное плодородие, меняет соотношение фитогормонов в листьях, стеблях и корнях бобовых растений. Вероятно, фитогормоны растений вызывали усиление метаболизма ризобий и ризобактерий, что приводило к повышению нитрогеназной активности растений, обработанных биопрепаратами. Отмечены сортовые особенности растений по содержанию эндогенных фитогормонов и по действию биопрепаратов, что свидетельствует о том, что стереотип реакции каждого сорта растений на воздействие одного и того же возбудителя (*Rhizobium*) характеризуется устойчивостью. Это подтверждает надежность взаимоотношений исследуемых систем. По-видимому, этим определяется неодинаковая способность одного и того же микроорганизма вызывать различные сдвиги в организме растения-хозяина. В бобово-ризобальном симбиозе клубеньковые бактерии вступают в тесные сигнальные взаимодействия с макросимбионтом, обеспечивая их азотным питанием. Инокуляция ризобиями и ризобактериями, возможно, вызывает изменения собственных гормональных систем растений, а сами бактерии выступали как сигнальные молекулы на изменение фитогормонов и на внесение биопрепаратов. Таким образом, фитогормоны растений вызывают усиление метаболизма ризобий и ризобактерий, что позволило характеризовать их действие как фактор, способствующий формированию эффективного симбиоза.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Проворов Н.А. Растительно-микробные симбиозы как эволюционный континуум // Общая биология. — 2009. — Т. 70. — № 1. — С. 10—34.
- [2] Тихонович И.А. и др. Интеграция генетических систем растений и микроорганизмов при симбиозе // Успехи современной биологии. — 2005. — Т. 125. — № 3. — С. 227—238.

- [3] *Парахин Н.В., Осин А.А., Осина В.С.* Влияние двойной инокуляции на симбиотическую азотфиксацию, продуктивность и качество семян сои // Вестник Орел ГАУ. — 2008. — № 3. — С. 2—4.
- [4] *Афанасьев Р.А.* Методические рекомендации по изучению эффективности нетрадиционных органических и органоминеральных удобрений. — М.: Агроконсалт, 2000.
- [5] *Павловская Н.Е., Бородин Д.Б.* Влияние биологически активных веществ, полученных на основе природных источников, на рост и развитие гороха // Вестник Орел ГАУ. — 2008. — № 3. — С. 18—20.
- [6] *Скоробогатова И.В., Захарова Е.В., Карсункина Н.П., Курапов П.Б., Соркина Г.Л., Кислин Е.Н.* Изменение содержание фитогормонов в проростках ячменя в онтогенезе и при внесении регуляторов, стимулирующих рост // Агрехимия. — 1999. — № 8. — С. 49—53.
- [7] *Волобуева О.Г., Скоробогатова И.В., Шильникова В.К.* Взаимодействие биологически активных веществ ризобий и ризобактерий с эндогенными фитогормонами растений гороха разных сортов // Агрехимия. — 2008. — № 8. — С. 42—45.
- [8] *Волобуева О.Г., Скоробогатова И.В., Шильникова В.К.* Влияние биопрепарата альбит на содержание фитогормонов в растениях фасоли разных сортов и эффективность симбиоза // Известия ТСХА. — 2010. — № 1. — С. 103—110.
- [9] *Орлов В.П., Орлова И.Ф., Щербина Е.А. и др.* Методика оценки активности симбиотической азотфиксации селекционного материала зернобобовых культур ацетиленовым методом. — Орел, 1984.
- [10] *Полевой В.В.* Роль ауксина в системах регуляций растений. — Л.: Наука, 1986.
- [11] *Медведев С.С.* Физиология растений. — СПб.: Изд-во СПбГУ, 2004.
- [12] *Пиневиц А.В.* Микробиология. Биология прокариотов. — СПб.: Изд-во СПбУ, 2007.
- [13] *Звягинцев Д.Г.* Почва и микроорганизмы. — М.: Изд-во МГУ, 1987.
- [14] *Мишиустин Е.Н., Шильникова В.К.* Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. — М., 1973.
- [15] *Hwang I., Sakakibara H.* Cytokinin Biosynthesis and Perception // *Physiol. Plant.* — 2006. — V. 126. — P. 528.
- [16] *Муромцев Г.С., Чкаников Д.И., Кулаева О.Н., Гамбург К.З.* Основы химической регуляции растений. — М.: Агропромиздат, 1987.

THE SIMBIOSIS NITROGEN-FIXATION AS A FACTOR OF ECOLOGICAL SAFETY AND SOIL'S FERTILITY

O.G. Volobueva

Russian State Agricultural University
Russian Academy of Sciences
Timiryazevskaya str., 49, Moscow, Russia, 127550

The possibility of symbiosis nitrogen-fixation's increasing by biopreparation treatment as a factor of ecological safety and soil's fertility has been studied. Endogenous hormones dynamics in beans treated with biopreparations albit and rhizotorphin has been traced back. The correlation between content of different phytohormones in vegetative organs of bean's plants and nitrogenasa activity has been revealed.

Ключевые слова: of symbiosis nitrogen-fixation's, phytohormones rhysoobius, rhizobacteria, biological products, nitrogenasa activity.