

АКАДЕМИЯ
НАУК
СССР

403 .
563
III 4776

БИОЛОГИЧЕСКИЙ АЗОТ в сельском хозяйстве СССР



«НАУКА»

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

БИОЛОГИЧЕСКИЙ АЗОТ в сельском хозяйстве СССР

Ответственный редактор

академик Е.Н. МИШУСТИН



МОСКВА "НАУКА"

1989

631.4

Б63

УДК 631.461.1/5

631.46

40.325

В сборнике рассмотрены вопросы, связанные с интенсификацией использования в сельском хозяйстве биологической фиксации молекулярного азота в целях получения растительной продукции, богатой ценным белком, и повышения плодородия почв. Этот естественный экологически и энергетически выгодный путь получения высококачественных пищевых и кормовых веществ, а также обогащения почвы азотом, в отличие от средств химизации, не требует дополнительных экономических затрат, не имеет отрицательных последствий для почвы, воды, атмосферы и биосфера.

Особое внимание уделено разработке агротехнических, микробиологических, а также генетических приемов активизации процесса азотфиксации, осуществляемого как симбиотическими, так и свободноживущими микробиорганизмами.

Для микробиологов и специалистов агропромышленного комплекса.

Редакционная коллегия:

академик *Е.Н. Мищустин*,
кандидат сельскохозяйственных наук *Н.И. Черепков*,
кандидат биологических наук *Т.В. Редькина*,
кандидат биологических наук *А.П. Кожемяков*

Рецензенты:

член-корреспондент АН СССР *Г.А. Заварзин*,
доктор биологических наук *Н.П. Львов*

Б 1905000000-509
055(02)-89 522-89, кн. 2

© Издательство "Наука", 1989

ISBN 5-02-004028-2

УДК 631.461/51:576.8

ЗНАЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО АЗОТА В АЗОТНОМ БАЛАНСЕ И ПОВЫШЕНИИ ПЛОДОРОДИЯ ПОЧВ СССР

Е.Н. Мишустин, Н.И. Черепков

Координационный совет по проблеме "Биологический азот" ГКНТ СССР
Институт микробиологии АН СССР, Москва

"Основные направления экономического и социального развития СССР на 1986–1990 годы и на период до 2000 года" нацелены на увеличение продуктов питания для населения страны. Первоочередной задачей является повышение урожайности зерновых культур с имеющимся сейчас 18 ц/га до 21–22 ц/га (Продовольственная программа СССР на период до 1990 года и меры по ее реализации //Материалы майского Пленума ЦК КПСС 1982 года. М.: Политиздат, 1982. С. 33). Это должно быть обеспечено значительным повышением плодородия почв, основанным на разработке рациональных систем земледелия. Последние должны быть энергово-водосберегающими, экологически безопасными как в отношении агропродуктов, так и окружающей среды.

В настоящее время имеющийся дефицит азота в большинстве почв страны покрывается внесением минеральных азотных удобрений, органических удобрений и биологической фиксацией молекулярного азота микроорганизмами, находящимися как в симбиозе с высшими растениями, так и свободно живущими в почве. "Биологический" азот, поставляемый микроорганизмами, повышает продуктивность почв.

В настоящей статье рассматривается значение вклада трех названных основных источников азота в плодородие почв в данное время и на перспективу. Для этого необходимо проанализировать структуру посевных площадей СССР (Народное хозяйство СССР в 1987 г. М.: Финансы и статистика, 1988. С. 183, 185, 186). Можно отметить, что значительную площадь занимают чистые пары и пропашные культуры (табл. 1). Их доля составляет более 1/4 пашни. Интенсивная обработка этих земель приводит к ускорению минерализации гумуса почвы и более выраженным эрозионным процессам, снижению плодородия почв, не компенсированного внесением удобрений.

Наблюдается ярко выраженная неравномерность распределения удобрений под разные культуры. По данным Госкомстата СССР (Народное хозяй-

Таблица 1

Структура используемых в сельском хозяйстве земель в 1987 г., млн га

Все сельскохозяйственные угодья	605,0
Пашня в обработке	232,4
Посевная площадь	211,5
Чистые пары	20,9
Зерновые	115,2
Кормовые	73,3
многолетние травы	30,2
однолетние травы	19,3
кукуруза на силос и зеленый корм	17,7
Технические	14,4
Картофель, овощи, бахчи	8,6
Естественные сенокосы	39,4
Пастбища	332,2

ство СССР..., 1988. С. 247, 248), в среднем под картофель, овощи, бахчи вносят 122–124 кг N и 284–289 кг NPK на 1 га и органических удобрений по 20–22 т/га. Под сахарную свеклу дают по 418 кг/га, под хлопчатник – 410 кг/га NPK, в том числе азота по 180 и 227 кг/га (табл. 2). Эти дозы азота создают экологически опасное содержание нитратов в агропродуктах и загрязняют окружающую среду. В таком же направлении действуют и высокие дозировки азота в интенсивных ("индустриальных") технологиях выращивания зерновых культур, когда стягиваются удобрения со всех площадей на 5–10% посевов зерновых.

В то же время под все зерновые, занимающие более половины пашни СССР (115,2 млн га), применяют небольшие количества минеральных удобрений – 89 кг/га (в том числе 36,5 кг N/га) и органических удобрений – 3,2 т/га.

Отмеченные низкие дозы удобрений под зерновые культуры не способны возместить естественную убыль плодородия этих почв при урожайности зерновых в 1987 г., равной 18,3 ц/га (Народное хозяйство СССР..., 1988. С. 171). В нашей работе путем балансовых расчетов на пашне СССР и на посевах зерновых в 1985 г. (Мищустин Е.Н., Черепков Н.И. Роль биологического азота в азотном балансе земледелия СССР и в повышении плодородия почв // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1987. № 5. С. 649–660) был показан дефицит азота соответственно в 13 и 37 кг/га, что равноценно потере гумуса в 125 и 675 кг/га с учетом корневых остатков.

В 1987 г. дозировки внесенных удобрений (табл. 3) незначительно возросли (на посевах зерновых: минерального азота – на 8 кг/га, органического азота – на 3 кг/га, увеличился также на 1 кг/га вклад биологического азота). В то же время возросла на 2 ц/га урожайность зерновых. В итоге возрос на 9 кг/га вынос азота, а дефицит азота уменьшился незначительно (табл. 4).

Обращает внимание тот факт, что возросшие посевные площади бобовых культур (по данным Госкомстата СССР в 1987 г., бобовые были убраны с 31 млн га, в том числе 6,4 млн га зернобобовых, 0,78 – сои, 17,6 –

Таблица 2

Внесение в почву под основные сельскохозяйственные культуры минеральных и органических удобрений (1987 г.)

Основные сельскохозяйственные культуры	Органические удобрения		Минеральные удобрения			
	млн т	т/га	NPK		N	
			млн т	кг/га	млн т	кг/га
Всего внесено на пашню	956,2	4,11	24,003	103,3	10,597	45,6
Внесено под сельскохозяйственные культуры	936,4	4,6	22,290	105,4	9,703	45,9
зерновые	353,1	3,2	10,5	89	4,206	36,5
картофель	127,8	20,6	0,781	284	0,197	122,1
хлопчатник	21,1	6,0	1,443	410	0,801	226,9
сахарная свекла	76,0	22,3	1,424	418,8	0,532	180,1
овощные и бахчевые	30,7	22,4	0,693	289	0,157	124,3
естественные сено-косы	9,2	0,23	1,337	33,9	0,723	18,3
севные травы	55,4	1,2	3,552	74,0	1,928	38,9

многолетних и 6,2 млн га однолетних бобовых трав) и возросшие их урожайности (особенно зернобобовых с 14,4 до 15,5 ц/га) увеличили азотфиксацию с 3,2 до 3,5 млн т. Это привело также к улучшению кормовых рационов и увеличению продуктивности животноводства (Народное хозяйство СССР..., 1988. С. 217):

Год	Мясо, млн. т	Молоко, млн. т	Яйца, млрд. шт.
1985	17,1	98,6	77,3
1987	18,9	103,8	82,7

По нашим расчетам (Мищустин, Черепков, 1987. С. 657) к 1990 г. в соответствии с плановым расширением посевов бобовых до 44 млн га, повышением урожайности зернобобовых до 18 ц/га, сена многолетних и однолетних бобовых трав до 35 и 25 ц/га соответственно, а также при внесении в почву 1,5 млрд т органических и 31 млн т минеральных удобрений (NPK) была показана возможность достижения плановой урожайности до 21 ц/га зерновых.

При этом было показано, что в балансе азота биологический азот симбиотической и несимбиотической азотфиксации займет значительное место: до 30% в поступлениях и до 45–50% в восстановлении плодородия почв. Но еще недостаточна будет доля симбиотического азота бобовых в урожае, особенно в кормах. Поэтому необходимо дальнейшее расширение посевов бобовых на 10–13 млн га (доведение их до 25% на пашне) и повышение их урожайности с помощью нитрагинизации, удобрение по потребности, обеспечение их семеноводства пчелоопылением, обеспечение необходимым парком сельскохозяйственных машин, введение новых сортов бобовых и эффективных штаммов клубеньковых бактерий.

Таблица 3

Расчет баланса азота на пашне на 1 га посевов (1987 г.)

Источник поступлений азота	Внесено азота на все посевы		Использовано урожаем	
	млн т	кг/га	%	кг/га
Минеральные удобрения	9,7	45,9	42	19,3
Органические удобрения, в том числе реутилизованный биологический азот урожая бобовых	4,68 (0,87)	23,0 (4,1)	23 (23)	5,3 (0,94)
Биологический азот бобовых растительных остатков	1,76	8,3	25	2,08
Биологический азот диазотрофов	4,23	20,0	15	3,0
Высев семян	1,26	6,0	80	4,8
Атмосферные осадки	1,05	5,0	10	0,5
Всего по источникам поступлений азота	22,68	108,2		34,98

	Потери				Остаток в почве	
	улетучивание		вымывание		% кг/га	кг/га
	%	кг/га	%	кг/га		
	24	11,0	9	4,1	25	11,5
	23	5,3	7	1,61	47	10,8
	(23)	(0,94)	(7)	(0,29)	(47)	(1,93)
	20	1,66	5	0,41	50	4,15
	20	4,0	5	1,0	60	12,0
	10	0,6	—	—	10	0,6
	20	1,0	30	1,5	40	2,0
		23,56		8,62		41,05

Таблица 4

Расчет баланса азота в почве под зерновыми культурами (1987 г.)

Источник поступлений азота	Внесено азота на посевы зерновых		Использовано урожаем	
	млн т	кг/га	%	кг/га
Минеральные удобрения	4,2	36,5	42	15,33
Органические удобрения, в том числе реутилизованный биологический азот урожая бобовых	1,76 (0,47)	16,0 (4,1)	23 (23)	3,68 (0,94)
Биологический азот бобовых растительных остатков	0,96	8,3	25	2,08
Биологический азот диазотрофов	2,30	20,0	15	3,0
Высев семян	0,69	6,0	80	4,8
Атмосферные осадки	0,58	5,0	10	0,5
Всего по источникам поступлений азота	10,49	91,8		29,39

	Потери				Остаток в почве	
	улетучивание		вымывание		% кг/га	кг/га
	%	кг/га	%	кг/га		
	24	8,76	9	3,29	25	9,12
	23	3,68	7	1,12	47	7,52
	(23)	(0,94)	(7)	(0,29)	(47)	(1,93)
	20	1,66	5	0,42	50	4,15
	20	4,0	5	1,0	60	12,0
	10	0,6	—	—	10	0,6
	20	1,0	30	1,5	40	2,0
		19,7		7,33		35,39

I. СИМБИОТИЧЕСКАЯ ФИКСАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА

УДК 631.461/51:576.8

О ВКЛАДЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО АЗОТА БОБОВЫХ В ПЛОДОРОДИЕ ПОЧВЫ

Е.П. Трепачев, Л.Д. Алейникова

Всесоюзный научно-исследовательский институт
удобрений и агропочвоведения им. Д.Н. Прянишникова, Москва

Продовольственной программой СССР предусмотрено значительное расширение посевов бобовых культур к 1990 г. Среди них наибольшие площади занимают многолетние бобовые. Удельный вес их в структуре всех многолетних трав достигнет 70% главным образом за счет люцерны и клевера. Наиболее значительно возрастет удельный вес этих культур в хозяйствах молочно-животноводческого направления – 30–40% всей пашни. Между тем экспериментального обоснования вклада биологического азота бобовых в плодородие почвы и урожайность последующих культур в литературе очень мало, притом методика опытов недостаточно обоснована.

Как правило, вклад азота бобовых в азотный фонд почвы оценивается только по количеству его в корневых и стерневых остатках. Корневая масса многолетних бобовых обычно учитывается перед подъемом пласта в слое почвы 30–50 см, считая, что здесь сосредоточено 75–90% корневой системы растений. Нередко корни отмывают от почвы на ситах с диаметром пор 1,5–2 мм, т.е. учитываются сравнительно огрубевшие корни, а более активное органическое вещество в виде тонких живых и отмерших корней, клубеньков, слущивающейся с корней чешуи, прижизненный опад и корневые эксудаты не принимаются в расчет. Допускается, что это органическое вещество не имеет существенного значения для плодородия почвы. К тому же его количественное определение затруднено. Поэтому важно выяснить, в какой мере учитываемые пожнивно-корневые остатки и неучитываемое органическое вещество, особенно многолетних бобовых, влияют на плодородие почвы, какова доля их участия в формировании урожаев последующих культур. Этот вопрос и был предметом наших исследований.

Опыты проведены на Центральной опытной станции ВИУА (Подмосковье) в полевых лизиметрах площадью 1 м² и глубиной 1,5 м с применением меченого азота. Вначале опыт проведен на люцерне и костреце, затем повторен на клевере луговом и тимофеевке. Почва дерново-под-

золистая средней оккультуренности. Поскольку опыты на бобовых и злаковых травах показали аналогичную закономерность, остановимся для краткости изложения экспериментального материала на люцерне (сорт Северная синегибридная 69) и костреце безостом (Маршанский 760). Внесение в почву меченого азота с высоким обогащением ^{15}N позволило изучить размеры биологической иммобилизации его почвой и отдельно пожнивно-корневыми остатками, степень использования внесенного азота и урожайность последующих зерновых культур после бобовых и злаковых предшественников.

Почва перед посевом люцерны и костреца была произвесткована из расчета 0,5 гидролитической кислотности, внесены $\text{P}_{180}\text{K}_{210}$, а также Mo в расчете на 3 года жизни трав. Семена люцерны обрабатывали нитрагином. На этом фоне при естественной влажности почвы изучали действие двух доз азота — N_{20} и N_{285} в форме сульфата аммония. Первую дозу в немеченной форме вносили один раз перед посевом (в качестве стартовой), вторую — с высоким обогащением ^{15}N (80–90 атом.%) вносили дробно в течение трех лет.

В сумме за 3 года получены следующие урожаи сена: кострец по варианту N_{20} — 63, по варианту N_{285} — 134,4 ц/га, люцерна — соответственно 239,0 и 226,5 ц/га.

После трех лет жизни трав в лизиметрах вручную послойно учитывали все видимые корни на глубину 100 см. В учтенную массу включали стерню высотой среза 3 см. Анализ содержания общего азота в живые и корнях в слое почвы 0–100 см показал: у костреца по варианту N_{20} — 33,7, по варианту N_{285} — 66,6 кг N/га; у люцерны — соответственно 130,3 и 132,2 кг N/га. Далее в одной серии лизиметров учтенные корни и живые были удалены из почвы, в другой — возвращена по слоям почвы соответственно их масса. Через 22 дня (конец августа) была посажена озимая пшеница (Мироновская 808) на почве с удаленными и оставленными в ней пожнивно-корневыми остатками. Весной следующего года она выращивалась с применением и без применения азота в немеченой форме.

Приведем данные урожайности и выноса азота озимой пшеницей, выращенной на почве после костреца и люцерны, получивших меченный азот в составе $\text{P}_{180}\text{K}_{210}\text{N}_{285}$ в сумме за три года (табл. 1).

Как видно из табл. 1, на почве с удаленными корнями и стерней костреца и люцерны урожай озимой пшеницы составил соответственно 16,5 ц/га и 38,8 ц/га (вариант 1), т.е. прибавка за счет неучтенного органического вещества люцерны была больше на 22,3 ц/га. При сохранении пожнивно-корневых остатков костреца в почве урожай озимой пшеницы не повысился (16,4 ц/га), а после люцерны возрос с 38,8 до 45,3 ц/га, т.е. дополнительная прибавка составила 6,5 ц/га, или почти в 3,5 раза меньше. Соответственно полученным урожаям возрастал вынос азота. При внесении азотного удобрения N_{60} в подкормку урожай озимой пшеницы резко возрос по обоим предшественникам как с удаленными (вариант 2), так и с сохраненными (вариант 4) пожнивно-корневыми остатками. Но и в этом случае урожай по люцерне был намного выше, чем по кострецу.

Использование в опытах азота в меченой форме позволило изучить

Таблица 1

Урожайность озимой пшеницы (ц/га) и вынос азота растениями (кг/га) на почве с удаленными и сохраненными пожнивно-корневыми остатками костреца и люцерны

Вариант опыта	По кострецу		По люцерне	
	Урожайность	Вынос азота	Урожайность	Вынос азота
Живые и корни удалены	16,5	56,9	38,8	87,8
То же + N_{60} в подкормку	33,0	100,5	56,6	129,0
Живые и корни сохранены	16,4	52,7	45,3	90,1
То же + N_{60} в подкормку	36,4	109,4	61,8	139,8

Таблица 2

Использование озимой пшеницей меченого азота, оставленного в почве люцерной и кострецом

Вариант опыта	^{15}N , мг/м ²				Доля от оставшегося в почве и растительных остатках, %	Доля от внесенного, %
	Зерно	Солома	Корни	Всего		
<i>По люцерне</i>						
Пожнивно-корневые остатки удалены из почвы	770	119	23	912	15,3	3,2
То же + N_{60} в подкормку	709	138	30	877	14,7	3,1
Пожнивно-корневые остатки оставлены в почве	899	103	31	1033	13,7	3,6
То же + N_{60} в подкормку	863	155	38	1056	14,0	3,7
<i>По кострецу</i>						
Пожнивно-корневые остатки удалены из почвы	260	134	29	423	6,4	1,5
То же + N_{60} в подкормку	411	169	68	648	9,8	2,3
Пожнивно-корневые остатки оставлены в почве	242	122	33	397	4,7	1,4
То же + N_{60} в подкормку	492	200	61	753	8,9	2,6

размеры потребления его озимой пшеницей по бобовым и злаковым предшественникам (табл. 2), а также иммобилизацию его почвой и отдельно растительными остатками.

После 3 лет жизни люцерны и костреца, получивших по 28,5 г $^{15}N/m^2$, в почве осталось соответственно 26,4 и 29,7% от внесенного азота. Основное количество его иммобилизовано самой почвой – 20,9% после люцерны и 23,2% после костреца, в растительных остатках лишь 5,5 и 6,5% соответственно. Эти данные свидетельствуют о весьма близкой количественной соразмерности трансформации внесенного азота в почве

при выращивании бобовой и злаковой культур и резком преобладании процесса иммобилизации азота почвой по сравнению с поглощением его учтенными растительными остатками.

В почве с удаленными растительными остатками люцерны озимая пшеница, как видно из табл. 2, использовала 912 мг N/m^2 (зерно, солома, корни), а при сохранении их в почве – 1033 мг m^2 . Это означает, что урожай озимой пшеницы более чем на 80% создавался за счет неучтенного органического вещества, созданного за 3 года жизни люцерны. По кострецу при удалении или сохранении растительных остатков без азотной подкормки озимая пшеница потребляла почти в 3 раза меньше меченого азота, чем по люцерне.

Как говорилось, опыт на люцерне и костреце повторен на клевере и тимофеевке в тех же лизиметрах по той же методике. Получена аналогичная количественная закономерность по характеру превращения меченого азота в почве, влиянию на урожайность озимой пшеницы и использованию ею азота.

Результаты проведенных опытов позволили заключить, во-первых, что биологический азот бобовых, и меченный азот, поступающие в почву, используются последней зерновой культурой пропорционально содержанию каждой из этих форм азота, во-вторых, повышение урожайности зерновой культуры происходит в основном за счет неучтенного активного органического вещества бобовых, а не их поживно-корневых остатков.

Возникает вопрос: сколько же накапливается в почве активного органического вещества и азота бобовыми? Это вопрос сложный. Но к настоящему времени уже накоплен определенный экспериментальный материал, который мы лишь частично рассматриваем.

Н.З. Станков [1964], изучая рост корней клевера 2-го года жизни и смеси его с люцерной и тимофеевкой на дерново-подзолистой почве, показал, что масса сухих отмерших тонких корней ($d < 1$ мм) в слое почвы 0–30 см уменьшилась за сезон на 46–62%. Важная роль тонких живых и отмерших корней люцерны в накоплении органического вещества и азота в почве показана и другими авторами [Белякова, 1957; Шлавицкая, Красильникова, 1977]. По Б. Моссе [1979], корневые волоски живут всего несколько недель или даже дней, после чего они опадают и быстро заселяются микроорганизмами. Е.Н. Мишустин [1972, 1981], Н.З. Станков [1964] показали, что в ризосфере бобовых в сотни раз больше микроорганизмов и в десятки раз больше азота, чем в почве без корней. С применением радиометрического метода выявлено, что количество органического вещества, которое поступает в почву в результате прижизненного отмирания корней и в виде корневых выделений, в 3–4 раза больше, чем методом отмычки корней при уборке [Иванов, 1973; Sauerbeck, Johnem, 1977]. Най и Тинкер [1980], используя ^{14}C , установили, что в почве под люцерной количество органического вещества, формируемого только за счет корневых выделений, составляет около 6% сухой массы растений. По Пейт [1978], люпин к концу вегетации более половины углерода, поглощенного листьями, выделяет в субстрат. Корневые выделения и корневой опад служат основным энергетическим субстратом для микроорганизмов-азотфиксаци-

торов. В то же время они продуцируют ростовые вещества (ауксин, гиббереллин и др.), способствуя этим увеличению массы корней и их поглотительной способности [Берестецкий, 1985; Васюк, 1985].

Эти и другие материалы свидетельствуют об огромной энергетической напряженности и мощности метаболизма корневой системы бобовых и о весьма сложном биохимическом механизме их воздействия на почву, что затрудняет оценку роли компонентов активного органического вещества, участвующего в создании плодородия. Однако интегральный эффект, как мы показали, весьма существен, что подтверждают также наши опыты, проведенные на дерново-подзолистой почве ЦОС ВИУА и типичном черноземе Белгородского филиала ВИУА [Трепачев и др., 1982]. В этих опытах за счет биологического азота клевера и люцерны по фону РК получена прибавка зерна 11–22 ц/га относительно урожая озимой пшеницы по кострецу. Если по клеверу и люцерне под пшеницу вносили в подкормку №₉ (на фоне РК), то ее урожайность была на 17 и 9 ц/га выше, чем по кострецу при той же дозе азота.

В стационарном севооборотном опыте на окультуренной дерново-подзолистой почве ЦОС ВИУА, проводимом Л.П. Волейдт, Г.И. Ваулиной с различными сортами озимой пшеницы, высеваемыми по клеверу без применения азотных удобрений, урожайность составила в 1982 г. – 52–58 ц/га, в 1983 г. – 43–51, в 1984 г. – 55–60, в 1985 г. – 56–69 ц/га. Близкие результаты получены и в других севооборотных опытах ЦОС ВИУА, а также на Белгородском филиале ВИУА при осуществлении мероприятий по защите растений от болезней, вредителей и сорняков.

Рассмотренный нами экспериментальный материал убеждает: за счет биологического азота клевера и люцерны в интенсивных (экономичных) технологиях возделывания зерновых обеспечивается урожайность в 45–60 ц/га без применения азотных удобрений. Планирование более высоких урожаев на фоне биологического азота клевера и люцерны требует осторожного подхода к обоснованию доз азотных удобрений. Как показали опыты, внесение азота в дозе, превышающей №₉, часто ведет к образованию непрочной соломины, раннему полеганию озимых (особенно после дождя) и, как следствие, ухудшению качества зерна.

Рассмотрим вклад органического вещества и азота многолетними бобовыми в плодородие почвы. Как мы показали, учет поживно-корневых остатков на третьем году жизни люцерны или клевера не отражает реальный вклад органического вещества и биологического азота в плодородие и азотный фонд почвы. Урожайность зерновых после многолетних бобовых создается главным образом за счет неучитываемого активного органического вещества (тонкие живые и отмершие клубеньки, экссудаты, прижизненный опад за 3 года). Это вещество и содержащиеся в нем биогенные элементы, прежде всего азот, обеспечивают прибавку урожая озимой пшеницы в 3 раза и более по сравнению с азотом поживно-корневых остатков из слоя почвы 0–100 см.

Определить ингредиенты и массу активного органического вещества бобовых практически невозможно. Поэтому возникает необходимость введения поправочного коэффициента при оценке количества органического вещества, поступающего в почву за 3 года жизни трав. По нашим расчетам, его можно принять равным 2,5–3. Это означает, что учтенную

массу стерни и корней в слое почвы 0–40 см следует умножить как минимум на 2,5. В полученную величину, однако, не входят потери урожая после каждого укоса трав. Их надо приплюсовывать к массе пожнивно-корневых остатков.

На основании сказанного формула расчета поступления в почву биологического азота примет следующий вид:

$$N_6 = K_{\Phi} (2,5M_{pk} N + M_{py} N),$$

где N_6 – биологический азот растительных остатков, кг/га; M_{pk} – масса сухих пожнивно-корневых остатков, ц/га; 2,5 – коэффициент поправки на полноту учета органического вещества; M_{py} – масса потерь урожая за все укосы, ц/га; N – содержание общего азота в M_{pk} и M_{py} , %; K_{Φ} – коэффициент азотфиксации (отношение количества фиксированного азота к общему).

Зная величину N_6 , важно установить в какой мере эта величина обогащает азотный фонд почвы. Для этого необходимо знать вынос азота бобовыми, который, как мы показали [Трепачев, 1979], рассчитывается согласно формуле $N_B = N_y \cdot (1 - K_{\Phi})$, где N_B – вынос азота, кг/га; N_y – общий азот в урожае сена за все годы выращивания бобовых, кг/га. Тогда формула обогащения почвы биологическим азотом (N_{ob}) примет следующий вид: $N_{ob} = K_{\Phi} (2,5M_{pk} N + M_{py} N) - N_y (1 - K_{\Phi})$, или $N_{ob} = N_6 - N_B$. Сделаем расчет по этой формуле, используя наши исходные экспериментальные данные для клевера: $N_{ob} = 0,74(2,5 \cdot 71,5 \cdot 2,3 + 4,1 \cdot 2,8) - 350,2 \cdot (1 - 0,74)$. Получаем следующие результаты. За три года жизни клевера в почву поступило органического вещества – 183,6 ц/га, общего азота – 424,3 кг/га, в том числе биологического 314,0 кг/га, вынос азота клевером – 91,1 кг/га, обогащение почвы биологическим азотом (N_{ob}) – 222,9 кг/га.

Теперь рассчитаем, какую урожайность зерновой культуры можно получить за счет общего и биологического азота органического вещества клевера, поступившего в почву. Согласно исследованиям [Черепков, 1965; Ишханова, 1981; Ladd et al., 1983], азот растительных остатков клевера и люцерны используется последующей культурой на 22–29%. Принимая коэффициент использования озимой пшеницей, установленный нами, равным 27% (или 0,27), находим, что пшеницей усвоено общего азота $424,3 \cdot 0,27 = 114,6$ кг/га, в том числе биологического – 74%, или 84,8 кг/га. На формирование 1 ц зерна с соломой озимой пшеницы потреблялось 2,9 кг/га азота. Тогда урожайность за счет общего азота органического вещества клевера составила $114,6 : 2,9 = 39,5$ ц/га зерна, за счет биологического – $84,8 : 2,9 = 29,2$ ц/га. Но урожай озимой пшеницы формируется с использованием как азота бобовых, так и азота почвы. При урожайности 50 ц/га она должна усвоить азота $50 \times 2,9 = 145$ кг/га. За счет азота клевера при урожае 39,5 ц/га было усвоено 114,6 кг/га. Разница $(145 - 114,6) = 30,4$ кг/га должна покрываться азотом почвы. Такое количество азота в севообороте, при котором на среднеокультуренной почве под предшествующие культуры вносили навоз, РК, известь (на кислых почвах) и повысилась активность несимбиотической азотфиксации, вполне гарантированно.

В хорошо окультуренной почве благодаря активным процессам аммо-

нификации и нитрификации создается высокий уровень минерального азота, обеспечивающий после бобовых, как мы уже показали, урожайность озимой пшеницы 50–60 ц/га без применения азотных удобрений. Следует также учитывать, что под влиянием мощной корневой системы многолетних бобовых улучшаются водно-физические свойства и структура почвы, растет содержание в ней гумуса. В процессе минерализации органического вещества, кроме азота, высвобождаются фосфор, калий, кальций, магний, другие макро- и микроэлементы [Шатилов и др., 1985]. Наибольшее количество этих веществ, согласно нашим исследованиям, образуется в период интенсивного роста озимой пшеницы (фаза выхода в трубку).

Как видим, фиксация бобовыми углерода и азота атмосферы – мощный фактор улучшения баланса органического вещества и азота почвы, повышения урожайности зерновых. При этом плодородие почвы, ее азотный фонд и урожайность последующих культур определяются главным образом неучитываемым активным органическим веществом (тонкими живыми и отмершими корнями, прижизненными корневыми эксудатами и опадом, клубеньками, высокообогащенными углеродом и азотом), масса же поживно-корневых остатков, учитываемых на третьем году жизни бобовых трав, и содержание в них азота играют гораздо меньшую роль. Обоснование уровней урожайности зерновых по бобовым предшественникам без применения азотных удобрений должно проводиться с учетом особенностей зоны, видов бобовых, агрохимических свойств почвы. Исследования в этом направлении позволяют оптимизировать систему азотного питания в плодосеменном севообороте в расчете на запланированный урожай.

В заключение отметим, что повышение почвенного плодородия и повышение урожайности зерновых и других культур за счет биологического азота бобовых должны предусматривать решения следующих задач: 1) обеспечение высокого урожая в севообороте однолетних и многолетних бобовых, как правило, без применения азотных удобрений путем мер усиления их азотфиксацией способности; 2) обоснование уровней урожайности зерновых и других культур после бобовых без применения азотных удобрений и 3) определение рациональных доз азотных удобрений на планируемую урожайность последующих культур севооборота с учетом вклада биологического азота бобовых. Результаты таких исследований по природным зонам позволят значительно снизить энергозатраты, улучшить охрану природы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Белякова Л.П. Пути повышения плодородия орошаемых почв Южного Таджикистана в условиях хлопок-люцернового севооборота. Сталинабад, 1957. 60 с.

Берестецкий О.А. Фиксация азота микроорганизмами в ризосфере и ризоплане небобовых культур // Бюл. ВНИИСельхозмикробиологии. 1985. Т. 42. С. 3–5.

Васюк Л.Ф. Ассоциативные азотфиксаторы и условия их эффективного применения // Там же. 1985. Т. 42. С. 16–18.

Иванов В.П. Корневые выделения и их значение в жизни фитоценозов. М.: Наука, 1973. 193 с.

Ишханова Г.В. Влияние поживно-корневых остатков клевера на биологические

процессы в почве и использование азота этих остатков райграсом // Тр. ВНИИСельхозмикробиологии. 1981. Т. 51. С. 53.

Мишустин Е.Н. Микроорганизмы и продуктивность земледелия. М.: Наука, 1972. С. 11.

Мишустин Е.Н., Черепков Н.И. Биологический азот в сельском хозяйстве СССР // С.-х. биология. 1981. Т. 16, № 3. С. 349–357.

Моссе Б. Аспекты анатомии корня, важные для микробиолога // Почвенная микробиология. М.: Колос, 1979. С. 62.

Най П.Х., Тинкер П.Б. Движение растворов в системе почва–растение. М.: Мир, 1980. С. 194, 365.

Станков Н.Э. Корневая система полевых культур. М.: Колос, 1964. С. 162.

Трепачев Е.П. О понятии "вынос азота" для бобовых культур // Агрохимия. 1979. № 11. С. 92.

Трепачев Е.П., Човжик А.Д., Спивак З.К. Реакция многолетних бобовых трав и их смесей со злаками на возрастающие дозы азотных удобрений // Агрохимия. 1980. № 10. С. 73.

Трепачев Е.П., Алейникова Л.Д., Човжик А.Д. Влияние интенсивно удобренных многолетних трав на продуктивность зерновых культур // Там же. 1982. № 11. С. 83.

Черепков Н.И. О доступности растениям азота корневых систем бобовых и злаковых трав // Там же. 1965. № 1. С. 23–27.

Шатилов И.С., Замараев А.Г., Чаповская Г.В. Программирование урожаев и воспроизводство плодородия дерново-подзолистой почвы // Вестн. с.-х. науки, 1985. № 12. С. 21.

Шлавицкая З.И., Красильникова Г.Б. Содержание микро- и макроэлементов в корневых остатках люцерны // Агрохимия. 1977. № 7. С. 61–67.

Ladd J. et al. Utilization by wheat crops of nitrogen from legume from residues decomposing in soil in the field // Soil Biochem. 1983. Vol. 15, N 3. P. 231–238.

Pate J.S. Heridge partitioning and utilization of net photosynthate in a nodulated annual legume // J. Exp. Bot. 1978. Vol. 29, N 109. P. 401–412.

Sauerbeck D.R., Johnem B.G. Root formation and decomposition during plant growth // Soil Org. Matters Stud. 1977. N 1. P. 141–146.

УДК 633.31+631.84

ПРИЕМЫ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ АЗОТФИКСАЦИИ И УРОЖАЯ БОБОВЫХ КУЛЬТУР

А.П. Кожемяков

Всесоюзный научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии, Ленинград

В решении проблемы дефицита кормового белка существенная роль принадлежит бобовым культурам. Преимущество бобовых над наиболее распространенными злаковыми культурами заключается в том, что бобовые производят на единице площади значительно больше белка, который лучше усваивается и наиболее сбалансирован по аминокислотному составу, а также включают в биологический круговорот азот атмосферы [Вавилов, Посыпаниов, 1978, Мишустин, 1979; Мишустин, Шильникова, 1973]. Фиксируемый бобово-ризобиальными системами азот является весьма существенной приходной статьей азотного баланса почв [Мишустин, 1983, Мишустин, Черепков, 1983].

Несмотря на значительное расширение объема применения азотных удобрений, перспективы широкого использования биологического азота в сель-

ском хозяйстве велики. Широкое использование биологического азота в земледелии обеспечивает снижение энергозатрат, экономию материальных ресурсов, уменьшает загрязнение окружающей среды продуктами деградации азотных удобрений [Мищустин, 1979; Мищустин, Черепков, 1983; Трепачев, 1980]. Кроме того, возделывание бобовых (и в первую очередь многолетних трав) способствует оптимизации микробиологической обстановки в почве, улучшению целого ряда ее физико-химических свойств, в результате чего существенно повышается почвенное плодородие [Воронова, Мамытов, 1981; Захарченко, Шилина, 1968; Хабарова, 1970].

К 1990 г. посевные площади под бобовыми культурами в СССР должны значительно возрасти [Вавилов, Посыпанов, 1978]. Однако для решения проблемы дефицита кормового белка недостаточно простого расширения посевов бобовых культур. Основное внимание необходимо уделить повышению эффективности их возделывания.

Один из наиболее важных приемов повышения продуктивности и качества бобовых растений — применение высокоеффективных препаратов клубеньковых бактерий (нитрагинизация). Во многих странах нитрагинизация подвергается до 70–80% посевов бобовых культур. В районах традиционного возделывания бобовых культур прибавка урожая от применения нитрагина составляет 2–4 ц/га зерна сои, 1–2 ц/га зерна гороха и люпина, 80–100 ц/га зеленой массы бобовых культур и 6–12 ц/га сена клевера и люцерны [Доросинский, 1978, 1985; Кожемяков, 1982; Кожемяков, Доросинский, 1981]. На почвах, где бобовые культуры ранее не возделывались и в которых нет специфичных для них клубеньковых бактерий, дополнительный сбор сельскохозяйственной продукции за счет применения препаратов клубеньковых бактерий достигает 50–100% и более.

Вопросы, связанные с разработкой приемов повышения эффективности нитрагинизации, изучаются в СССР в рамках Географической сети опытов (ГСО) с нитрагином, в сферу деятельности которой входит сравнительное изучение эффективности новых штаммов клубеньковых бактерий различных видов бобовых культур, полученных при селекционно-генетической работе, и отбор из них наиболее производственно ценных по показателям активности, конкурентоспособности и технологичности. В результате многолетних исследований изучены возможности рационального сочетания нитрагинизации с внесением азотных удобрений и гербицидов, проведены сравнительные испытания различных форм препаратов клубеньковых бактерий. Исследования в ГСО с нитрагином проводятся под научно-методическом руководством ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии по единым специально разработанным схемам опытов. Полученные материалы систематизируются и подвергаются математическому анализу с использованием ЭВМ "Минск-32".

Для проверки эффективности нитрагинизации за 1976–1985 гг. проведено более 800 полевых опытов с основными бобовыми культурами, в 65% из которых получена достоверная прибавка урожая относительно небактеризованных вариантов (табл. 1). Наиболее эффективным оказалось применение нитрагина под люцерну и сою. Нитрагинизация посевов гороха (эта культура занимает в СССР более 4 млн га) [Вавилов, Посыпанов, 1978] обеспечивает достоверную прибавку урожая зерна лишь в каждом третьем случае. Низкая результативность нитрагина на горохе отмечалась и

Таблица 1

Эффективность нитрагинизации основных бобовых культур в СССР

Культура	Количество проведенных опытов	Урожай в контроле, ц/га	Средняя прибавка урожая, ц/га	Прибавка урожая к контролю, %
Горох				
зерно	170	22,1	1,3	5,9
зеленая масса	45	152,0	16,9	11,2
Соя, зерно	215	16,0	3,2	20,0
Люпин				
зерно	54	16,2	1,6	10,0
зеленая масса	42	288,0	44,5	15,5
Люцерна, зеленая масса	125	355,0	58,0	16,4
Клевер, сено	80	56,5	5,6	10,0
Фасоль, зерно	16	16,9	2,8	16,0
Вика				
зерно	12	21,7	3,0	13,8
зеленая масса	22	185,0	18,6	10,0
Кормовые бобы, зерно	15	27,8	2,8	10,0
Эспарцет, сено	14	112,0	20,5	13,6
Нут, зерно	4	12,0	2,9	24,2
Чина, зерно	5	25,8	2,0	7,7

ранее [Доросинский, 1978, 1985]. В связи с этим необходимо усилить исследования в области генетики и селекции клубеньковых бактерий гороха, с целью повышения их конкурентоспособности.

Следует учесть, что эффективность нитрагина, определяемая лишь по высоте урожая растений, существенно занижена, так как нитрагинизация, как правило, значительно повышает содержание протеина в растениях [Доросинский, 1985; Кожемяков, Доросинский, 1981]. С учетом этого фактора эффективность нитрагинизации существенно повышается, особенно для таких культур, как соя, люцерна и горох (табл. 2). В этом случае дополнительный сбор белка колеблется от 82 (у гороха) до 410 кг/га (у люцерны).

Используя эти данные, мы оценили роль нитрагинизации в получении дополнительного протеина в настоящее время и на перспективу. Проведенные расчеты показывают, что только за счет применения нитрагина на всех посевах бобовых в 1985 г. можно было бы получить дополнительно около 5 млн т протеина и в значительной степени покрыть дефицит растительного белка, составляющий от 6 до 9 млн т [Вавилов, Посыпанов, 1978]. Реальное же количество дополнительного белка, полученного за счет применения нитрагина на площади 3,3 млн га, составило в 1985 г. более 700 тыс т.

Следует отметить, что бобовые культуры в СССР занимают сравнительно небольшую площадь пашни, приблизительно 11% (24,8 млн га). В США бобовыми культурами (главным образом соей и люцерной) занято 30% пахотных земель и на 50–60% всей площади их посевов применяются препараты клубеньковых бактерий [Мищустин, 1979].

Таблица 2

Влияние нитрагинизации на содержание протеина, продуктивность растений и сбор белка (по данным Географической сети опытов с нитрагином 1976–1985 гг.)

Культура	Средний урожай, ц/га		Содержание сырого протеина на сухое вещество, %		Сбор протеина, кг/га		Прибавка к контролю, %
	контроль	с нитрагином	контроль	с нитрагином	контроль	с нитрагином	
Горох							
зерно	22,3	23,6	22,0	23,8	490	572	16,7
зеленая масса	155,0	170,0	15,8	18,0	630	770	22,2
Соя, зерно	16,5	20,0	32,5	37,2	536	744	39,0
Люпин, зерно	16,4	18,5	35,4	38,8	580	720	24,2
Люцерна, зеленая масса	360,0	420,0	17,5	19,7	1250	1660	32,8
Клевер, сено	58,0	64,5	15,5	17,1	900	1105	22,8

Увеличение посевных площадей под бобовыми культурами в земледелии СССР, как это следует из "Основных направлений экономического и социального развития СССР на 1986–1990 годы и на период до 2000 года", в значительной мере усилит значение нитрагинизации как источника дополнительного растительного белка.

Даже при существующей, сравнительно невысокой на ряде культур эффективности нитрагина, за счет его применения можно будет к 1990 г. получить дополнительно ежегодно около 3 млн т протеина. Эффект может стать еще значительнее при повышении качества нитрагина благодаря селекции новых высокоактивных и конкурентоспособных штаммов клубеньковых бактерий, правильному подбору растения-симбионта (т.е. параллельной селекционно-генетической работе с бобовыми растениями и клубеньковыми бактериями) и рациональному использованию нитрагина.

Проведенный анализ имеющихся результатов выявил, что эффективность нитрагина существенно колеблется в зависимости от почвенно-климатических условий. Так, при нитрагинизации сои средняя эффективность препарата колеблется от 7,2 ц/га в Казахской ССР до 1,7 ц/га в Дальневосточном регионе. Высока эффективность нитрагина на Украине и в Молдавской ССР (25–35% прибавки относительно контроля). Применение нитрагина под горох наиболее целесообразно в Украинской ССР и Западной Сибири. Нитрагинизация люцерны эффективна во всех районах, где проводились опыты. Наибольшие прибавки зеленой массы люцерны получены в Западной Сибири и в Украинской ССР (табл. 3).

Повышения эффективности нитрагинизации можно достигнуть в результате оптимизации условий для функционирования бобово-ризобиального симбиоза. Главными факторами, ограничивающими активность симбиотической азотфиксации в агрофитоценозах, являются кислая реакция среды, дефицит (реже избыток) влаги, низкое содержание в почве подвижных соединений фосфора, калия и некоторых микроэлементов [Мищустин, Шильникова, 1973; Посыпанов, 1985].

Таблица 3

Эффективность нитрагинизации сои, гороха и люцерны (ц/га) в различных регионах страны

Регион	Соя (зерно)		Горох (зерно)		Люцерна (зеленая масса)	
	Урожай в контроле	Прибавка от нитрагина	Урожай в контроле	Прибавка от нитрагина	Урожай в контроле	Прибавка от нитрагина
РСФСР						
Волго-Вятский	—	—	19,2	2,1	195	54
Центральный	—	—	23,5	1,1	275	65
Поволжский	17,8	3,6	25,0	0,9	280	78
Северо-Кавказский	21,2	3,8	26,2	2,3	—	—
Западно-Сибирский	—	—	15,3	1,6	380	72
Украинская ССР						
Донецко-Приднепровский	16,5	4,0	22,0	2,6	220	45
Южный и Юго-Западный	20,2	5,7	26,6	2,5	250	52
Белорусская ССР	—	—	19,4	2,8	410	64
Казахская ССР	22,7	7,5	17,1	2,5	—	—
Молдавская ССР	15,2	3,5	—	—	370	82
Узбекская ССР	18,4	7,8	—	—	390	60

Особое значение для формирования и активности симбиотических систем имеет содержание в среде доступных растениям соединений азота. Исследования, посвященные влиянию уровней азотного питания на показатели активности азотфиксации и продуктивность бобовых растений, весьма многочисленны и часто противоречивы [Посыпанов, 1977; Трепачев, 1976, 1980; Трепачев, Атрашкова, 1973; Чундерова, Кожемяков, 1981].

Ряд авторов считают, что при создании благоприятных для процесса азотфиксации условий бобовые культуры способны полностью обеспечить свои потребности в азотном питании только за счет усвоения атмосферного азота [Посыпанов, 1974; Трепачев, 1976; Трепачев, Атрашкова, 1973; Трепачев и др., 1971].

Многие исследователи рекомендуют внесение небольших ("стартовых") доз азотных удобрений, способствующих устранению дефицита в азотном питании в период до начала активной азотфиксации. При этом повышается продуктивность растений, а количество фиксированного азота не снижается [Козлов, 1962; Лапинскас, 1978; Моторин, 1972; Федоров, Подъяпольская, 1951].

Возможность рационального сочетания "биологического" и "технического" азота при применении повышенных доз азотных удобрений обосновывается тем, что после временного подавления процесса азотфиксации создаются условия для интенсивного использования атмосферного азота на более поздних фазах развития растений [Гукова, 1972; Калниныш, 1965].

Противоречивость полученных данных объясняется тем, что исследования проводились с разными бобовыми культурами и в неодинаковых почвенно-климатических условиях, что делает несопоставимыми многие из проведенных исследований.

Для практического решения вопроса о сочетании нитрагинизации с внесением азотных удобрений в ГСО с нитрагином по единой схеме проведено более 200 полевых опытов с основными бобовыми культурами. Результаты этих исследований свидетельствуют о различной реакции отдельных культур бобовых на внесение азотных удобрений на фоне их инокуляции активными штаммами *Rhizobium*. Так, наиболее отзывчива на внесение минеральных азотных удобрений люцерна, а наименее — горох. Азотные удобрения в дозе 30–60 кг/га способствуют увеличению урожая зеленой массы люцерны в среднем на 10–15%; зерна сои и гороха — на 5–7%.

В существенной мере эффективность применения азотных удобрений определяется почвенно-климатическими условиями. Так, применение азотных удобрений под горохом малоэффективно на серых лесных почвах Центрального района РСФСР и южных черноземах УССР (Одесская область). Достаточно стабильны прибавки урожая зерна гороха (10–15%) при применении средней дозы азотных удобрений (60 кг/га) на типичных черноземах Поволжья, серых лесных почвах Западной Сибири и дерново-подзолистых почвах Украины (табл. 4). Наиболее высока эффективность азотных удобрений на бедных дерново-подзолистых почвах Волго-Вятского региона и Белоруссии.

Внесение низких доз азотных удобрений достоверно повышало результативность нитрагинизации на черноземных почвах Поволжья и Юга Украины. Прибавка за счет внесения низкой дозы азотных удобрений получена также в Донецко-Приднепровском регионе (на 1,0–1,5 ц/га) и в Белоруссии (на 20–25 ц зеленой массы/га).

Внесение средних доз азотных удобрений на фоне нитрагинизации целесообразно на дерново-подзолистых почвах Волго-Вятского и на серых лесных почвах Центрального районов РСФСР. Высокие дозы минерального азота, как правило, резко снижали (чаще всего до нуля) эффективность нитрагинизации гороха.

Среди зернобобовых культур посевы сои занимают первое место в мире. В СССР эта культура размещается на 0,8–0,9 млн га, а в перспективе посевные площади под соей должны достигнуть 1,5 млн га. Причем ареал возделывания этой культуры станет более широким за счет Южной зоны европейской части СССР и среднеазиатских республик. В связи с этим были изучены особенности азотного питания сои как в районах давнего ее возделывания (Дальний Восток, Западная Грузия), так и в новых районах (где, как правило, нет специфических для сои почвенных популяций клубеньковых бактерий). В результате проведенных исследований установлено, что азотные удобрения под сою были малоэффективны на сероземах Казахской ССР на фоне хлопково-люцерновых севооборотов (табл. 5).

Нестабильную эффективность азотных удобрений отмечали в условиях Дальневосточного и Северо-Кавказского региона. Здесь действие минеральных удобрений существенным образом зависит от гидротермических условий. Наиболее высока эффективность азотных удобрений на урожай

Таблица 4

Влияние азотных удобрений (кг/га) и нитрагинизации на урожай гороха (ц/га)

Регион	Урожай в контроле	Прибавка от азотных удобрений			Прибавка от нитрагина на фоне азотных удобрений			
		20-40	60	90-120	0	20-40	60	90-120
РСФСР								
Волго-Вятский	18,2	2,2	2,8	4,2	2,6	2,4	2,0	0,7
Центральный	22,0	0	0,4	0,6	0,9	1,3	1,2	0,6
Поволжский	26,8	1,2	2,6	2,7	1,1	2,2	0,9	0
Западно-Сибирский								
зерно	13,3	0,4	2,0	3,6	1,1	0,6	0	0
зеленая масса	220,0	3,5	13,3	21,0	9,8	6,2	0	0
Украинская ССР								
Донецко-Приднепровский	26,4	0,8	1,5	3,0	2,7	2,4	1,3	0,8
Южный	22,4	0,3	0,8	1,3	0,9	1,9	0,9	0,3
Белорусская ССР								
зеленая масса	133	13	40	55	20	30	12	0

Таблица 5

Влияние азотных удобрений (кг/га) и нитрагинизации на урожай зерна сои (ц/га)

Регион	Урожай в контроле	Прибавка от азотных удобрений			Прибавка от нитрагина на фоне азотных удобрений			
		20-40	60	90-120	0	20-40	60	90-120
РСФСР								
Северо-Кавказский	20,9	1,5	2,9	3,1	3,7	1,5	2,0	0
Поволжский	11,7	5,4	6,4	8,7	2,8	2,7	2,4	1,4
Дальневосточный	15,9	2,4	2,0	1,8	1,2	0,4	0,6	0,6
Украинская ССР								
Донецко-Приднепровский	16,4	1,8	2,2	2,8	2,3	1,8	0,9	0,6
Южный и Юго-Западный	22,0	2,1	2,8	3,6	2,8	1,8	0,9	0,5
Крымская область	18,2	2,4	5,7	8,2	9,2	6,4	5,5	3,7
Грузинская ССР								
Молдавская ССР	13,9	1,8	3,9	5,2	1,3	0,9	0,4	0
Казахская ССР	14,8	3,3	5,4	8,0	2,7	1,9	1,7	0,2
Узбекская ССР	20,7	0,1	0,9	1,1	3,7	2,5	1,3	1,1

Таблица 6

Влияние азотных удобрений (кг/га) и нитрагинизации на продуктивность люцерны и клевера (за 1975–1985 гг.) (ц/га)

Регион	Урожай в контроле	Прибавка от азота			Прибавка от нитрагина на фоне азота			
		20–40	60	90	0	20–40	60	90
<i>Люцерна, зеленая масса</i>								
РСФСР								
Центральный	270	21	48	62	64	59	46	33
Западно-Сибирский	295	16	40	66	63	67	47	0
Украинская ССР								
Донецко-Приднепровский	120	28	39	54	37	29	15	6
Белорусская ССР	395	37	103	152	34	55	28	0
Азербайджанская ССР	330	32	54	12	38	30	12	0
<i>Клевер</i>								
РСФСР								
Волго-Вятский, сено	51,5	0	0	0	6,5	2,0	0	0
Центральный, зеленая масса	172,0	15,0	32,0	43,0	30,0	26,0	18,0	0
Западно-Сибирский								
сено	44,2	1,4	5,4	3,7	6,9	4,2	1,5	0
зеленая масса	308,0	12,0	8,0	0	21,0	0	0	24
Украинская ССР								
Донецко-Приднепровский, зеленая масса	210,0	10,0	16,0	14,0	24,0	21,0	17,0	3

сои в Поволжском регионе РСФСР, Грузинской и Молдавской ССР, Крымской области (табл. 5). Прибавки урожая зерна сои при внесении средних (60 кг азота/га) и высоких (90 кг азота/га — без орошения и 120 кг азота/га при орошении) доз азотных удобрений достигают на почвах этих регионов 5–8 ц/га.

Наиболее высокая результативность за счет нитрагинизации сои отмечена в Северо-Кавказском регионе РСФСР, Казахстане, Узбекистане и в Крымской области (прибавка урожая зерна составляет от 3,5 до 11,5 ц/га). Такие результаты определяются отсутствием спонтанного инфицирования местными расами клубеньковых бактерий, достаточным уровнем увлажнения (в Крыму, Узбекистане и Казахстане — за счет орошения, на Северном Кавказе — за счет осадков), стабильно высокой инсоляцией в течение всего вегетационного периода.

Наименьшая эффективность от нитрагинизации характерна для Дальневосточного региона и Грузии, где почвы насыщены специфичными для сои популяциями клубеньковых бактерий и имеют неблагоприятную для симбиоза кислотность.

Установлено, что внесение азотных удобрений под сою нецелесообразно в сочетании с нитрагинизацией на выщелоченных карбонатно-мицелилярных черноземах Северного Кавказа, обыкновенных типичных и южных черноземах Украины, орошаемых сероземах Южного Казахстана и Узбекистана.

Внесение невысоких доз азотных удобрений (20–40 кг азота/га) на фоне нитрагинизации обеспечивает дополнительную прибавку урожая зерна (до 5–6 ц/га) на орошаемых черноземах Поволжья и в меньшей степени (на 1,5–2 ц/га) на торфяно-глеевых посевах Дальнего Востока. Средние дозы азотных удобрений в сочетании с нитрагинизацией существенно повышают урожай зерна сои в Грузии и Молдавии. Повышенные дозы азотных удобрений на фоне нитрагинизации не оказывают достоверного положительного влияния на урожай, но существенно подавляют развитие симбиотического аппарата, резко снижают продуктивность азотфиксации.

Одной из важнейших кормовых культур является люцерна. Она обладает большим азотфикссирующим потенциалом, посевы 2-го и более поздних годов жизни при благоприятных условиях способны накапливать до 500–600 кг/га биологического азота. Урожай зеленой массы люцерны при внесении минеральных удобрений повышался во всех районах, где проводились исследования (табл. 6). Средняя доза азотных удобрений (60 кг/га) увеличивала продуктивность люцерны на серых лесных почвах Томской и Брянской областей, а также на светло-каштановых почвах Азербайджана в среднем на 15–17%. Еще более сильное действие оказывает такая доза минерального азота на урожай зеленой массы люцерны на легких по механическому составу дерново-подзолистых почвах Украинского Полесья и Белоруссии (прибавка урожая составляет 25–35%). Нитрагинизация во всех случаях существенно повышала продуктивность люцерны (табл. 6).

В Белоруссии и в Азербайджане прибавка за счет нитрагинизации эквивалентна прибавке от внесения невысокой дозы азотных удобрений, в Донецко-Приднепровском регионе — от средней дозы, а на серых лесных почвах Томской и Брянской областей — от высокой дозы минерального азота.

Применение невысокой дозы азотных удобрений способствовало увеличению эффективности нитрагинизации на дерново-подзолистых почвах Белоруссии и существенно не влияло на результативность инокуляции растений на серых лесных почвах Томской и Брянской областей. В перечисленных регионах целесообразно сочетание нитрагинизации с внесением азотных удобрений в дозах 30–60 кг/га. Дальнейшее увеличение доз минеральных удобрений несколько повышает продуктивность растений, но значительно снижает результативность нитрагинизации, а следовательно, подавляет процесс фиксации атмосферного азота. На светло-каштановой почве Азербайджанской ССР любые дозы азотных удобрений снижали прибавку от нитрагинизации. Поэтому в этой республике при обработке семян нитрагином внесение азотных удобрений следует исключать.

Посевы клевера занимают в нашей стране более 6 млн га. Это одна из основных традиционных кормовых культур в СССР. Несмотря на распространение в почвах "местных" рас клубеньковых бактерий во всех регионах, где проводились исследования, нитрагинизация повышала урожай сена или зеленой массы клевера (от 8 до 80%). Внесение азотных удобрений оказывало менее значительное и неустойчивое влияние на продуктивность клевера (табл. 6). Так, на дерново-подзолистых почвах Волго-Вятского региона азотные удобрения не оказали существенного влияния на урожай сена клевера; слабый эффект от внесения минерального азота был получен на дерново-подзолистых почвах Украинского Полесья и серых лесных почвах Томской области. Внесение азотных удобрений на фоне нитрагинизации во всех случаях снижало результативность применения препаратов клубеньковых бактерий пропорционально дозам вносимого минерального азота.

Создание новых высокоэффективных форм препаратов азотфиксирующих микроорганизмов в значительной степени может упростить технологию применения инокулянтов бобовых, улучшить их совмещение с целым рядом интенсивных технологий возделывания растений (применение пестицидов и минеральных удобрений). В связи с этим в учреждениях ГСО с нитрагином проведены сравнительные испытания нескольких форм препаратов клубеньковых бактерий: ризоторфин, гранулированный ризоторфин, ризобин (сухая форма).

Полученные материалы свидетельствуют, что на крупносемянной культуре (сои) обычная и гранулированная формы ризоторфина проявили примерно одинаковую эффективность (табл. 7). Увеличение дозы гранулированной формы препарата с 2,5 до 5 кг/га не влияло на его эффективность (в некоторых опытах даже отмечена тенденция в повышении урожая зерна сои на фоне дозы 2,5 кг/га).

Ризобин существенно уступал ризоторфину как по стабильности действия (достоверная прибавка урожая наблюдалась лишь в половине проведенных опытов), так и по величине прибавки и степени влияния на содержание белка в зерне сои.

Сравнительная оценка эффективности препаратов клубеньковых бактерий на мелкосемянной бобовой культуре (клевер) позволила установить довольно высокую эффективность сухой формы препарата клубеньковых бактерий (табл. 7), однако ризоторфин способствовал более значительному увеличению содержания и накопления протеина в сене клевера.

Таблица 7

Влияние форм препаратов клубеньковых бактерий на накопление белка и урожая сои и клевера

Вариант	Опыты с достоверной прибавкой, %	Урожай зерна, ц/га	Содержание белка в зерне, %	Накопление белка, кг/га	Накопление белка, % к контролю
<i>Соя</i>					
Контроль	—	17,0	37,0	660	—
Ризоторфин	92	+2,3*	+1,9**	788	119
Ризобин	50	+1,1	+0,6	740	111
Гранулированный ризоторфин					
2,5	82	+2,6	+1,7	802	121
5,0	87	+1,8	+1,8	775	118
<i>Клевер, сено</i>					
Контроль	—	58,0	16,2	1170	—
Ризоторфин	75	+7,0	+1,0	1355	116
Ризобин	75	+9,6	-0,1	1330	114
Гранулированный ризоторфин					
2,5	66	+4,8	-0,2	1235	106
5,0	80	+6,2	+0,6	1360	116

* Прибавка урожая к контролю.

** Изменение (±) содержания белка к контролю.

Эффективность гранулированной формы была ниже, чем у промышленного ризоторфина. В то же время увеличение дозы гранулированной формы с 2,5 до 5 кг/га повышало стабильность действия и эффективность гранулированной формы. Вероятно, доза гранулированной формы ризоторфина для достижения максимального эффекта должна быть сравнима с массой семян (при одинаковом размере гранул и семян). Однако целесообразность внесения препарата в объеме 10–12 кг/га должна быть обоснована экономическими расчетами.

Таким образом, на основании многолетних исследований установлена положительная роль нитрагинизации в увеличении урожая и повышении качества основных бобовых культур. В существенной мере эффективность нитрагинизации определяется комплексом агроэкологических условий.

Выявлены оптимальные варианты сочетания автотрофного и симбиотрофного источников азотного питания растений. Установлено негативное влияние повышенных доз азотных удобрений на результативность инокуляции растений. Внесение умеренных (30–60 кг N/га) доз азотных удобрений целесообразно лишь на слабоокультуренных дерново-подзолистых и серых лесных почвах. Существенные различия установлены в реакции отдельных видов бобовых на внесение азотных удобрений.

Испытания эффективности различных форм препаратов клубеньковых бактерий выявили преимущество ризоторфина для крупносемянных куль-

тур. При инокуляции мелкосемянных культур перспективно использование сухой формы препарата (ризобин).

Рациональное применение препаратов клубеньковых бактерий на 40–50% посевных площадей бобовых позволит получить дополнительно около 3 млн т полноценного растительного белка [Кожемяков, 1982].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Вавилов П.П., Посьпанов Г.С. Бобовые, азот и проблема белка // Вестн. с.-х. науки. 1978. № 9. С. 44–56.

Воронова Р.П., Мамытов А.А. Роль многолетних трав в расширенном воспроизведстве почвенного плодородия // Актуальные проблемы почвенной науки в Киргизии. Фрунзе, 1981. С. 157–176.

Гукова М.М. Азотные удобрения усиливают азотфиксацию // Зерновое хоз-во. 1972. № 10. С. 33.

Доросинский Л.М. Основные вопросы применения нитрагина в СССР // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1978. № 4. С. 607–612.

Доросинский Л.М. Повышение продуктивности бобовых культур и улучшение их качества // Минеральный и биологический азот в земледелии СССР. М.: Наука, 1985. С. 142–150.

Захарченко И.Г., Шилина Л.И. Роль бобовых культур в азотном балансе дерново-подзолистых почв // Агрохимия. 1968. № 1. С. 53–61.

Калнишь А.Д. Влияние минерального азота на эффективность симбиоза клубеньковых бактерий с бобовыми растениями // Роль микроорганизмов в питании растений и повышении эффективности удобрений. Л.: Колос, 1965. С. 40–50.

Кожемяков А.П. Основные итоги работы Географической сети опытов с нитрагином // Технология производства и эффективность применения бактериальных удобрений. М., 1982. С. 19–27.

Кожемяков А.П., Доросинский Л.М. Эффективность применения нитрагина в СССР // Бюл. ВНИИСельхозмикробиологии. 1981. № 34. С. 3–6.

Козлов И.В. О влиянии связанных соединений азота на азотфиксирующую активность клубеньковых бактерий // Вестн. с.-х. науки. 1962. № 2. С. 49–54.

Лапинская Э.Б. Влияние сочетания инокуляции клубеньковыми бактериями и минерального азота на урожай клевера красного и ячменя (в последействии) // Бюл. ВНИИСельхозмикробиологии. 1978. № 19, вып. 2. С. 24–27.

Мищустин Е.Н. Биологический азот и его значение в сельском хозяйстве // Вестн. АН СССР. 1979. № 3. С. 59–68.

Мищустин Е.Н. Пути улучшения азотного баланса пахотных почв СССР и выполнение Продовольственной программы // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1983. № 3. С. 325–344.

Мищустин Е.Н., Черепков Н.И. Пути улучшения азотного баланса земледелия СССР // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева. 1983. Т. 28, № 4. С. 16–21.

Мищустин Е.Н., Шильникова В.К. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. М.: Наука, 1973. 388 с.

Моторин И.И. Влияние минеральных удобрений на урожай люцерны // Вопросы химизации земледелия. Иркутск, 1972. С. 83–88.

Посьпанов Г.С. О применении стартовых доз азотных удобрений под бобовые культуры // Агрохимия. 1974. № 1. С. 17–24.

Посьпанов Г.С. Антагонизм и синергизм симбиотического и минерального азота в питании бобовых // Технология производства зернобобовых культур. М.: Колос, 1977. С. 82–91.

Посьпанов Г.С. Азотфиксация бобовых культур в зависимости от почвенно-климатических условий // Минеральный и биологический азот в земледелии СССР. М.: Наука, 1985. С. 75–84.

Трепачев Е.П. О некоторых аспектах симбиотической фиксации азота бобовыми культурами // Агрохимия. 1976. № 1. С. 138–147.

Трепачев Е.П. Биологический и минеральный азот в земледелии: пропорции и проблемы // С.-х. биология. 1980. Т. 15, № 2. С. 178–189.

Трепачев Е.П., Атрашкова Н.А. Минеральный азот и бобовые растения // Агрохимия. 1973. № 6. С. 3–12.

Трепачев Е.П., Атрашкова Н.А., Хабарова А.И. Экспериментальная проверка принципов исследования размеров фиксации азота бобовыми растениями // Новое в изучении биологической фиксации азота. М.: Наука, 1971. С. 145–154.

Федоров М.В., Подъяпольская В.П. Влияние условий выращивания бобовых растений на образование клубеньков и урожая растений // Докл. АН СССР. 1951. Т. 77, № 1. С. 121.

Хабарова А.И. Накопление в занятом пару азота бобовых и использование его последующими культурами // Биологический азот в земледелии Нечерноземной зоны СССР. М.: Колос, 1970. С. 135–144.

Чундерова А.И., Кожемяков А.П. Влияние удобрений и пестицидов на биологическую фиксацию атмосферного азота // Охрана природы и применение химических средств в сельском и лесном хозяйстве. Л.: Наука, 1981. С. 82–88.

УДК 576.851.155:381.524.12

КОНКУРЕНТНАЯ СПОСОБНОСТЬ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

Л.М. Доросинский

Всесоюзный научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии, Ленинград

Для повышения продуктивности бобовых культур, накопления в них белка и активной фиксации ими молекулярного азота большое значение имеет инокуляция семян бобовых активными клубеньковыми бактериями, т.е. применение нитрагина. Масштабы нитрагинизации в нашей стране в последние годы значительно возросли. Предполагается дальнейший рост производства и применения этого эффективного препарата клубеньковых бактерий, использование которого, как показывают данные ГСО, увеличивает урожай бобовых культур и улучшает его качество. Однако в ряде случаев не наблюдалось эффекта от его применения. Показано, что в этих опытах подавляющее большинство клубеньков на корнях бобовых растений было образовано не нитрагинной культурой *Rhizobium*, а спонтанными клубеньковыми бактериями, находящимися в данной почве и характеризующимися в большинстве опытов слабой азотфиксацией активностью. Клубеньки, образованные спонтанными клубеньковыми бактериями, в большинстве своем были мелкие, белого цвета, т.е. имели признаки неактивных клубеньков.

На подобные факты указывают работы ряда авторов [Израильский, Рыжкова, 1967; Макарова, 1981; Васильева, 1985; Ham et al., 1971] по определению эффекта от инокуляции сои стандартным препаратом нитрагина на почвах, в которых содержалось большое количество спонтанной культуры *R. japonicum*. Опыты были проведены в семи местностях штата Миннесота (США). Как указывают авторы, положительный эффект от инокуляции был только в небольшом количестве опытов. Было установлено, что подавляющее количество клубеньков на корнях сои было образовано спонтанными клубеньковыми бактериями, которые характеризовались слабой азотфиксацией активностью. Количество клубеньков, образованных

Таблица 1

Влияние различных штаммов *Rhizobium* на сухую массу и содержание азота в красном клевере

Штамм	Сухая зеленая масса г/сосуд	Содержание азота в растении, мг/сосуд
Смесь Ротамстедских штаммов	28,0±1,32	701±34,4
То же + Согун	8,95±1,91	218±46,3
То же + штамм "а"	26,84±0,85	673±32,7
То же + штамм Согун + штамм "а"	21,89±1,57	550±40,7

опытными (нитрагинными) штаммами, колебалось всего в пределах 0–17%.

Холланд [Holland, 1970] инокулировал семена подземного клевера коммерческим препаратом нитрагина и обнаружил, что вес сухой зеленой массы и содержание азота как у инокулированных растений, так и в контроле было низким. По заключению автора, в обоих этих вариантах подавляющее количество клубеньков было образовано спонтанными клубеньковыми бактериями, что подтвердилось и данными серологического анализа. Возникает естественный вопрос: что же обусловило во всех этих случаях преимущество спонтанных клубеньковых бактерий, образование именно ими, а не нитрагинной расой подавляющего количества клубеньков на корнях бобовых растений. Такое преимущество в указанных опытах объяснялось высокой конкурентной способностью спонтанных клубеньковых бактерий, т.е. их способностью занимать доминирующее положение в ризосфере бобового, несмотря на присутствие других штаммов этого же вида, быстро размножаться и образовывать подавляющее количество клубеньков по сравнению с нитрагинным штаммом. В этом случае именно эти конкурентоспособные бактерии определяют характер взаимоотношений с растением-хозяином в азотфикссирующей симбиотической системе.

Таблица 2

Конкурентная способность и эффективность штаммов клубеньковых бактерий люпина на дерново-слабоподзолистой почве

Штаммы клубеньковых бактерий люпина	Клубеньки, образованные штаммами, %			Клубеньки, образовавшиеся при инокуляции, %
	363а	367а	370а	
Контроль	—	—	—	—
363а	88			88
370а			75	75
367а		57		57
363а+370а	64		28	92
367а+370а		34	39	73
363а+367а	64	12		76

Никол, Торnton [Nicol, Thornton [1941] исследовали роль конкурентной способности клубеньковых бактерий в их симбиотических взаимоотношениях с красным клевером. В одном из ветеринарных опытов, проведенном в песке, авторы использовали смесь диких штаммов, выделенных из почвы Ротамстедской опытной станции, а также неактивный штамм С ("Согул") и штамм активный "а", полученный авторами из Стокгольма. Результаты этого опыта, приведенные в табл. 1, показывают, что штамм С был более конкурентоспособен, чем смесь диких штаммов, чем и объясняются низкие результаты второго варианта опыта. Штамм "а" также обладал высокой конкурентоспособностью, он вызывал образование большого количества клубеньков и тем самым в значительной степени снял отрицательное действие штамма С. Таким образом, свойства различной конкурентной способности, присущие этим штаммам на различных почвах, проявились также и в песчаной культуре.

Нередко в опытах, проведенных в нашей стране, отсутствие эффекта от нитрагинизации объясняется слабой конкурентной способностью примененных в нитрагине штаммов клубеньковых бактерий. Установлено [Доросинский, Макарова, 1977], что штаммы клубеньковых бактерий люпина 367а и 370а, весьма эффективные в монокультуре и образующие в этом случае подавляющее количество клубеньков, в совместной культуре с высококонкурентоспособным штаммом 363а образовали сравнительно малое количество клубеньков (табл. 2).

Из данных табл. 2 видно, что штамм 363а по отношению к спонтанным *R. lupini* на данной почве оказался наиболее конкурентоспособным, им было образовано 88% клубеньков. Конкурентоспособность штаммов 367а и 370а на данной почве была несколько ниже, на долю спонтанных клубеньковых бактерий приходилось уже 24–43% клубеньков. При одновременном внесении двух штаммов *Rhizobium* повышается их конкурентная способность и соответственно снижается участие спонтанных клубеньков бактерий в образовании клубеньков. Наибольшие прибавки урожая и содержание азота в растениях получены при инокуляции производственными штаммами 363а и 367а. При инокуляции отдельными штаммами прибавка

Клубеньки, образованные спонтанными клубеньковыми бактериями, %	Воздушно-сухая селеная масса, г/сосуд	Прибавка урожая		Азот, %
		г/сосуд	%	
100	9,2	—	—	2,44
12	16,2	7,0	76	2,87
25	15,0	5,8	61	2,54
43	16,5	7,3	79	2,65
8	20,3	11,1	120	3,02
27	19,6	10,4	113	2,79
24	21,5	12,3	134	2,95

урожая составила для разных вариантов опыта 61–70%, а при инокуляции двумя штаммами одновременно – 113–114%. Полученные данные подтверждают возможность использования в нитрагине смеси нескольких активных и конкурентоспособных штаммов клубеньковых бактерий.

Влияние конкурентоспособности штаммов клубеньковых бактерий на образование клубеньков хорошо видно из следующего примера. Нами было получено от научных учреждений два высокоэффективных штамма *R. lupini* 371а и 372а. По эффективности они не уступали производственным штаммам 363а и 367а. Для того, чтобы рекомендовать их как производственные, необходимо было их проверить по конкурентоспособности. Эту их особенность выявляли в вегетационном опыте. Для идентификации штаммов 371а и 372а исследовали специфическую антисыворотку 371а штамма *R. lupini*, так как предварительный серологический анализ показал, что штаммы 371а и 372а, а также спонтанные клубеньковые бактерии в контроле относятся к одной серологической группе. Как видно из табл. 3, более конкурентоспособным по отношению к почвенным *R. lupini* оказался штамм 363а, им было образовано 84% клубеньков. Менее конкурентоспособный 370а образовал 63% клубеньков. При инокуляции растений штаммами 371а и 372а инокулянты были обнаружены в 50% клубеньков, остальные клубеньки образовали спонтанные клубеньковые бактерии. При определении конкурентной способности штаммов 371а и 372а по отношению к штамму 363а последний был доминирующим и исключал участие двух первых штаммов в образовании клубеньков. Штаммы 371а и 372а оказались также менее конкурентоспособными по сравнению со штаммом 370а, который полностью подавлял их при проникновении в корневые волоски. Таким образом, несмотря на достаточно высокую эффективность, штаммы 371а и 372а нельзя было рекомендовать для производства нитрагина под люпин.

В связи с тем большим значением, которое сейчас придается свойству конкурентоспособности штаммов клубеньковых бактерий, при селекции производственно-ценных из них учитывают не только азотфиксирующую активность и вирулентность, но и обязательно конкурентную способность.

Чем же определяется конкурентная способность штаммов?

Во-первых, это свойство присуще штамму клубеньковых бактерий в большей или меньшей степени. Оно проявляется одинаково не только в почве, в борьбе за проникновение в корневые волоски бобового, но также и при культивировании бактерий в жидких питательных средах и в торфе. Это было хорошо показано ранее [Jenkins et al., 1954]. При выращивании клевера на фоне его инокуляции как на агаре, так и в разных почвах установлено, что конкурентная способность разных штаммов *R. trifolii* одинаково проявляется как в агаре, так и в почве.

Во-вторых, важной особенностью, определяющей конкурентную способность штаммов клубеньковых бактерий наряду с их природными свойствами, является их генетическая близость к растению-хозяину. Показано, что генетические отклонения в растениях или бактериях могут привести к полной или частичной потере способности образовывать клубеньки [Vincent, 1967]. В почве местности Виллард, несмотря на присутствие в ней сильных, конкурентоспособных штаммов клубеньковых бактерий сои, доминировал конкурентослабый штамм, так как его генотип соот-

Таблица 3

Конкурентная способность штаммов 371а и 372а

Вариант опыта	Клубеньки, образованные данным штаммом, %			Вариант опыта	Клубеньки, образованные данным штаммом, %		
	363а	370а	371а		363а	370а	371а
Контроль	—	—	—	363а+370а	62	33	—
363а	84	—	—	363а+371а	88	—	0
370а	—	63	—	363а+372а	87	—	0
371а	—	—	50	370а+371а	—	61	0
372а	—	—	50	370а+372а	—	55	0

Таблица 4

Реакция растений сои сортов Харди и Хемптон на инокуляцию штаммами *R. japonicum*

Штамм	Количество азота в зеленой массе растений, мг/сосуд		Урожай зерна, ц/га	
	Харди	Хемптон	Харди	Хемптон
СС 708	20,5	19,3	30,5	35,7
СС 709	16,6	20,0	36,5	35,8
СВ 1809	8,7	23,3	27,9	36,5
СВ 2016	22,5	21,6	35,6	34,2
Контроль	7,6	8,4	25,4	31,6

вествовал генотипу растения-хозяина [Caldwell, Hartwig, 1970]. В связи с этим положением высококонкурентоспособный штамм на одном сорте растения может снизить эту свою способность на другом сорте. В опытах с двумя сортами сои и различными штаммами клубеньковых бактерий штамм СВ 1809 в зависимости от совместимости его генетической характеристики с исследуемыми сортами был более конкурентоспособен и эффективен на сорте Харди [Diatloff, Brockwell, 1976] (табл. 4)

Следует подчеркнуть в связи с этим еще одно обстоятельство, которое выявилось в опытах [Макаров, 1981]: нитрагин может не дать ожидаемого эффекта также и в том случае, если в ризосфере инокулируемого бобового растения количество спонтанных микроорганизмов, хотя и слабоконкурентного нитрагинного штамма, значительно превосходит количество высококонкурентного нитрагинного штамма (табл. 5).

Из табл. 5 видно, что уже десятикратное увеличение вносимых микроорганизмов в пользу менее конкурентоспособного 370а штамма изменило соотношение образуемых клубеньков в сторону его преобладания. При дальнейшем увеличении дозы штамма 370а в 100 и 1000 раз по сравнению с высококонкурентным штаммом 363а все клубеньки на люпине были образованы менее конкурентоспособным штаммом 370а. Данная особенность может служить объяснением причин неудач применения нитрагина

Таблица 5

Конкурентные отношения штаммов *Rhizobium lupini*
при разных дозах внесения бактерий

Доза инокуляции, тысяча бактерий на семя	Клубеньки, образованные штаммом, %		
	363а	370а	363а
50	50	63	37
50	500	33	67
50	5000	0	100
50	50000	0	100

в ряде случаев: нитрагин может не дать ожидаемого эффекта не только вследствие слабой конкурентоспособности производственного штамма клубеньковых бактерий, но также вследствие численного преимущества почвенных популяций *Rhizobium* над нитрагинным штаммом. Поэтому очень важно, чтобы нитрагин содержал высокий титр бактерий, что будет в большинстве случаев способствовать образованию подавляющего количества клубеньков именно нитрагинным штаммом.

Правда, экологические факторы, и в особенности генетическая характеристика растения-хозяина, могут оказать свое влияние на взаимоотношения конкурентоспособных и неконкурентоспособных бактерий, представленных в почве в различных количествах [Макарова, 1982]. Увеличение дозы слабоконкурентоспособного штамма 95 кормовых бобов в 10 и 100 раз по сравнению с высококонкурентоспособным штаммом 97 не обеспечило ему преимущества при проникновении его в корневые волоски, хотя и значительно повысило процент образуемых им клубеньков.

Для оценки конкурентной способности клубеньковых бактерий используют различные методы.

Серологический метод, при котором серологическую принадлежность бактерий, вызвавших образование клубеньков, определяют с помощью специфических антисывороток, для получения которых проводят иммунизацию кроликов изучаемыми клубеньковыми бактериями. Установлено, что бактерии рода *Rhizobium* характеризуются не только видоспецифическими, но и штаммоспецифическими антигенами, что позволяет в большинстве случаев довольно четко провести их идентификацию и установить, каким штаммом вызвано образование клубеньков, т. е. характеризовать их конкурентную способность. Указанный метод довольно точен и широко применяется для подобных микробиологических работ. Существенным недостатком является его трудоемкость и необходимость содержания лабораторных животных.

Более простым методом определения конкурентной способности штаммов *Rhizobium* является резистентный метод, позволяющий отличить один исследуемый штамм от другого по методике устойчивости их к высокой дозе антибиотика. Для получения резистентных мутантов исходные штаммы клубеньковых бактерий высевают на среду с постепенно возрастающей концентрацией какого-либо антибиотика (чаще всего стреп-

Таблица 6

Сравнение методов определения конкурентной способности клубеньковых бактерий кормовых бобов [Берестецкий и др., 1983]

Штамм	Сухая зеленая масса, г/сосуд		Конкурентная способность, %	
	Штамм ⁺	Штамм ⁺ + штамм ⁻	по массе растений	серологическим методом
89	1,5	0,9	33	56
95	1,8	0,8	17	24
97	1,7	1,6	91	95

Примечание. 89⁺, 95⁺ и 97⁺ – активные штаммы сравниваются с высококонкурентоспособным неактивным штаммом 87. Вес сухой зеленой массы в контроле 0,6 г.

томицина). При этом часть бактерий адаптируется и приобретает наследственную устойчивость к высокой дозе антибиотика. Такая устойчивость сохраняется в течение ряда лет не только на лабораторных средах, но и при пассаже через бобовое растение. При высеве из клубенька на агаровую питательную среду с высокой концентрацией стрептомицина (500 мкг/мл) прорастают только резистентные мутанты клубеньковых бактерий, что позволяет судить о конкурентоспособности примененных для инокуляции штаммов. Резистентный метод страдает существенным недостатком: не все штаммы, адаптированные к антибиотику, сохраняют свои свойства неизмененными. В ряде случаев у мутантов *Rhizobium* наблюдалось снижение азотфикссирующей активности и конкурентной способности – основных показателей производственной ценности клубеньковых бактерий. Поэтому резистентный метод нельзя считать равноценным серологическому методу.

Простой и довольно достоверный метод определения относительной конкурентной способности клубеньковых бактерий предложен французскими учеными [Amarger, 1975]. Он заключается в том, что это свойство *Rhizobium* определяется по массе сухих растений при смешанной инокуляции их активным и неактивным штаммами, обладающими высокой конкурентоспособностью. Масса выращиваемых в стерильном вегетационном опыте растений разных вариантов зависит от количества клубеньков, образованных тем или иным штаммом, что, в свою очередь, характеризует относительную их конкурентоспособность. Достоверность этого метода была проверена в сравнении с серологическим и резистентным методами [Берестецкий и др., 1983].

Как видно из приведенных данных табл. 6, высокая конкурентная способность штамма 97 была одинаковой при определении как по серологическому методу, так и по массе сухих растений. Приблизительно одинаковые результаты были получены при определении конкурентной способности в штаммах 89 и 95 как по резистентному методу, так и по сухой массе растений. Таким образом, проведенные исследования подтвердили высокую надежность метода определения относительной конкурентной способности клубеньковых бактерий (в данном случае кормовых бобов) по массе сухих растений при смешанной инокуляции активными и неактивными штаммами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Берестецкий О.А., Новикова А.Т., Князева В.Л. Простой метод оценки конкурентной способности клубеньковых бактерий // Микробиология. 1983. Т. 52, № 4. С. 651– 657.

Васильева Н.Д. Серологическое разнообразие клубеньковых бактерий *Rhizobium* яропицум в почвах СССР и селекции эффективных конкурентоспособных штаммов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1985. 17 с.

Доросинский Л.М., Макарова Н.М. Конкурентная способность штаммов *Rhizobium lupini* // Микробиология. 1977. Т. 46, № 1. С. 143–148.

Израильский В.П., Рыжкова А.С. Применение серологического метода исследования для отбора наиболее конкурентоспособных штаммов клубеньковых бактерий в лабораторных условиях // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1967. № 4. С. 567–574.

Макарова Н.М. Конкурентная способность *Rh. lupini* и *Rh. leguminosarum* (*Vicia faba*) как фактор эффективности нитрагинизации: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1982. 18 с.

Amarger N.C. Competition between strains of *Rhizobium* for the formation of nodules selection of competitive strains // Proc. V Amer. Rhizobium Conf. Paris, 1975. P. 9.

Caldwell B.E., Hartwig E.E. Serological distribution of soybean root nodule bacteria in soils of southeastern USA // Agron. J. 1970. Vol 62, N 5. P. 621–622.

Diatloff A., Brockwell J. Symbiotic properties of *Rhizobium japonicum* and competitive Success in nodulation of two *glycine* cultivars by effective and ineffective strains // Austral. J. Exp. Agr. and Anim. Husb. 1976. Vol. 16, N 81. P. 514–521.

Jenkins H.V., Vincent J.M., Laurie M. The root nodule bacteria as factors in clover establishment in red basaltic soils of the Lismore district New South Wales III Field inoculation Trials // Austral. J. Agr. Res. 1954. N 5. P. 77–89.

Ham G.E., Caldwell V.B., Johnson H.W. Evolution of *Rhizobium japonicum* inoculants in soils containing naturalized population of *Rhezobia* // Agron. J. 1971. Vol. 63, N 2. P. 301–303.

Holland A.A. Competition between soil-and seedborne *Rhizobium trifolii* in nodulation of introduced *Trifolium Subterraneum* // Plant and Soil. 1970. Vol 32, N 2. P. 293–302.

Nicol H., Thornton H.G. Competition between *relatus* strain of nodule bacteria and its influence on infection of the legumes host // Proc. Roy. Soc. Ser. B. 1941. Vol. 130, N 1. P. 32–59.

Vincent J.M. Symbiotic specificity // Austral. J. Sci. 1967. Vol. 29, N 7. P. 182–189.

УДК 630.46

ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО АЗОТА ЛЮПИНА НА ПРОДУКТИВНОСТЬ СЕВООБОРОТА

В.В. Бузмаков

Московская сельскохозяйственная академия им К.А. Тимирязева

В условиях интенсификации земледелия, когда увеличивается вынос из почвы питательных веществ растениями и усиливается влияние факторов интенсификации и растений на свойства почвы, возрастает значение научно обоснованного чередования культур. Это особенно важно для повышения культуры земледелия и получения высоких устойчивых урожаев на бедных песчаных и супесчаных почвах.

В колхозе имени Ленина Гусь-Хрустального района Владимирской области все пахотные земли представлены песчаными и супесчаными дерново-подзолистыми почвами с низким естественным плодородием. Поэтому

Таблица 1

Урожайность кормового люпина в колхозе им. Ленина (в среднем за год)

Год	Семена		Зеленая масса	
	Площадь, га	Урожайность, ц/га	Площадь, га	Урожайность, ц/га
1966–1970	44	5,6	128	169
1971–1975	98	7,6	175	213
1976–1980	113	13,2	249	211
1982	134	15,0	253	220
1986	150	16,0	260	325

длительное время здесь получали низкие урожаи. В последнее десятилетие положение резко изменилось: в колхозе из года в год повышается культура земледелия, растет урожайность сельскохозяйственных культур.

Главный источник повышения продуктивности земледелия колхоза – это осуществление комплекса мер по окультуриванию и повышению плодородия легких почв, включающего освоение научно обоснованных севооборотов с кормовым люпином, озимой рожью, картофелем, а также применение органических и минеральных удобрений.

Посевные площади кормового люпина при самых разнообразных формах его использования в севооборотах с каждым годом в хозяйстве увеличиваются. Если в 1966 г. кормовой люпин на зерно и силос в севооборотах сеяли в колхозе на площади 170 га, то в последние годы его площади достигли 400 га, что составляет 30% пашни.

Земледельцы строго выполняют требования агротехники выращивания кормового люпина. Его возделывают в севообороте как парозанимающую культуру, в смешанных, а также в поукосных и пожнивных посевах.

Колхоз им. Ленина специализируется на производстве зерна, свинины и молока, поэтому в хозяйстве осваивают интенсивные четырехпольные севообороты с 1–1,5 полями кормового люпина, 1–2 полями зерновых культур и 1 полем картофеля; интенсивные шестипольные севообороты с 2 полями кормового люпина, 3–4 полями зерновых культур и 1 полем пропашных. Структуре посевых площадей при четырехпольном севообороте следующая: люпин кормовой – 25–37,5% в том числе на зерно – 12,5%, зерновые культуры – 37,5–50%, картофеля – 25%. При шестипольном: люпин кормовой – 33,2%, в том числе на семена – 16,6%, зерновые культуры – 50%, картофель – 16–17%.

Благодаря освоению севооборотов с системой удобрений и соблюдению всей технологии выращивания люпина колхоз получает хорошие урожаи семян и зеленой массы люпина (табл. 1).

Вследствие медленного развития в первые фазы люпин может сильно угнетаться сорняками. Учитывая это, в колхозе поля, предназначенные для посева люпина, сразу после уборки предшествующей культуры лущат дисковыми лущильниками, а затем после появления всходов сорняков пашут на зябь. На участках, засоренных пыреем, проводят вычесывание корневищ пырея пружинными культиваторами.

Под люпин, возделываемый в занятом пару на зеленый корм и силос,

Таблица 2

Урожай сельскохозяйственных культур в колхозе им. Ленина
(в среднем за год)

Год	Зерновые культуры, ц/га	Картофель, ц/га
1966–1970	7,3	116
1971–1975	12,6	153
1976–1980	15,1	196
1981–1985	17,6	200
1986	19,0	240

Таблица 3

Изменение агрохимических свойств почвы в колхозе им. Ленина

Свойство	1970 г.	1975 г.	1985 г.
pH почвенного раствора	4,7	5,0	5,3
Содержание гумуса, %	1,1	1,15	1,2
Содержание подвижных питательных веществ, мг на 100 г почвы:			
P ₂ O ₅	3,6	7,2	9,2
K ₂ O	3,9	6,2	8,5

вносят обычно 3–4 ц/га аммиачной воды, 3–4 ц/га фосфорных и калийных удобрений из расчета P_{40–60} K_{40–60}. Перед посевом семена люпина обрабатывают нитрагином и молибденовокислым аммонием.

Наблюдения показали, что люпин, посевянный в апреле и до 5 мая, лучше вызревает на зерно и обычно бывает низкорослый. Люпин, посевянный 15–25 мая, дает высокорослый стеблестой с большим урожаем зеленой массы. Управляя сроками сева люпина, агрономы хозяйства добиваются наибольшей эффективности при возделывании его на зерно или на зеленую массу. При возделывании на семена кормовой люпин в колхозе размещают на южных склонах, где больше тепла. Обработку почвы применяют такую же, как при посеве культуры на зеленую массу. Удобрения вносят примерно из расчета P_{40–60} K_{60–70} кг/га. Для посева используют семена со всхожестью не ниже 80–90%, обработанные нитрагином и молибденовокислым аммонием.

Пятую часть площади желтого люпина на семена сеют широкорядным двухстрочным способом при норме высева 100–110 кг/га (0,85–0,9 млн всхожих семян), а на остальной площади проводят рядовой посев из расчета 170 кг/га (1,39 млн шт). Широкорядные двухстрочные посевы позволяют проводить механизированную борьбу с сорняками, лучше сохранить влагу, дают наибольшее количество бобов и семян на растении как в засушливые, так и во влажные годы. Сев люпина на семена хозяйство обычно проводит в период с 20 апреля по 5 мая.

Расширение посевных площадей кормового люпина с различными формами его использования в севооборотах, а также увеличение внесенных удобрений на гектар пашни (минеральных до 2–3 ц/га, органических до 12–20 т/га) за последние годы в значительной степени повысило плодородие и супесчаных почв. Это привело к повышению урожайности сельскохозяйственных культур (табл. 2).

Освоение севооборотов с различным использованием кормового люпина, применение системы удобрений и обработки почвы в севооборотах позволило хозяйству улучшить также агрохимические и агрофизические свойства легких почв, повысить их плодородие и продуктивность (табл. 3).

За последние годы эффективность земледелия в колхозе значительно повысилась (табл. 2). Если в среднем за годы восьмой пятилетки (1966–1970 гг.) урожайность зерновых составила лишь 7,3 ц/га, то в десятой (1971–1975 гг.) она возросла до 12,6 ц/га, в десятой (1976–1980 гг.) – 15,1 ц/га. В 1981–1985 гг. урожай зерновых – 17,6 ц/га. Аналогично изменялось урожайность картофеля (116, 153, 196, 200 ц/га). Урожай этой культуры в 1986 г. составил 240 ц/га.

Экономическая эффективность севооборотов в колхозе им. Ленина повышается из года в год. Так, например, стоимость валовой продукции в расчете на гектар севооборотной площади увеличилась с 433 руб. в 1975 г. до 736 руб. в 1985 г., чистый доход с гектара севооборотной площади вырос в 2,5 раза (с 17,5 до 45 руб.), повысилась рентабельность хозяйства с 14,7 до 42%, увеличился выход кормовых единиц на 1 руб. затрат.

Таким образом, на основании изложенного выше можно заключить, что использование поживных и корневых остатков кормового люпина при различных способах его выращивания в сочетании с применением органических и минеральных удобрений в севообороте позволяет повышать плодородие песчаных и супесчаных почв и урожайность сельскохозяйственных культур.

УДК 631.461.5

ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ЭФФЕКТИВНОСТЬ АЗОТФИКСАЦИИ БОБОВЫМИ КУЛЬТУРАМИ

Г.С. Посьпанов

Московская сельскохозяйственная академия им. К.А. Тимирязева

Большинство исследований роли климатических факторов во взаимоотношениях макро- и микросимбионтов прежде проводили в условиях умеренного климата. Поэтому естествен был и вывод об оптимуме симбиоза при температуре 18–26°С и влажности почвы 60–80% полевой влагоемкости [Мищустин, Шильникова, 1973]. Однако, по нашим новым наблюдениям, в Воркутинской тундре Заполярья при температуре немногого выше 0° такие бобовые, как копеечник арктический, астрагал субарктический, клевер люпинолистный и другие, формируют активный симбиотический аппарат. В Узбекистане и Таджикистане при температуре воздуха

до 45° горох не формирует клубеньки, но соя, нут и маш в наших опытах активно фиксировали азот воздуха.

Определяющим активность симбиоза условием являются генотип вида и сорта и экологически приспособленный штамм микросимбионта, поэтому в каждой зоне надо подбирать соответственно культуры и сорта макросимбионтов и штаммы клубеньковых бактерий.

Установлено, что масса клубеньков и количество фиксированного азота воздуха зависят от обеспеченности органов растения фотоассимилятами. Растения с большим симбиотическим аппаратом обладают большей интенсивностью фотосинтеза и дыхания, чем растения с меньшим аппаратом, произрастающие в тех же условиях [Посыпанов, 1983].

Принято считать, что все бобовые обогащают почву азотом в оптимальных условиях симбиоза. Но это не во всех случаях в отношении однолетних бобовых подтверждается данными с использованием современных методов [Посыпанов, 1983; Трепачев, 1985]. Однолетние бобовые к началу налива семян накапливают в вегетативной массе много азота, в том числе в корнях до 2–2,5% от абсолютно сухого вещества. При наливе же семян идет перераспределение азота их вегетативных органов в генеративные, поскольку задача генотипа однолетних растений – сформировать максимум жизнеспособных семян, чтобы продолжить существование вида. К фазе полной спелости семян содержание азота в стеблях и корнях существенно уменьшается до 0,5–2%. В их корневых и пожнивных остатках (1–2 т/га у гороха и вики и 3–4 т/га у бобов и люпина) на пашне остается азота от 16–40 кг/га до 60–80 кг/га.

В 1985 г. урожайность зернобобовых в СССР была 14,4 ц/га зерна (соответственно 20 ц/га соломы и 14 ц/га растительных остатков, включая корни и стерневые остатки). В этом количестве растительных остатков зернобобовых содержание азота могло быть 1,4% или 19,6 кг азота на 1 га. В том же году урожайность зерновых злаковых была 16 ц/га зерна, 20 ц/га соломы и 20 ц/га растительных остатков с содержанием в последних 0,5% азота, или 10 кг азота на 1 га.

Следовательно, зернобобовые оставили в почве азота, фиксированного из воздуха, 9,6 кг/га. Величина эта небольшая, но тем не менее остатки зернобобовых повышают на 2–3 ц/га урожай последующей зерновой культуры. В случае же меньшей урожайности зернобобовых (например, 7 ц/га зерна) или при вычесывании соломы с корнями может получиться так, что зернобобовые возьмут из почвы столько же азота, сколько оставят в ней за счет азотфиксации. Многолетние бобовые – люцерна, клевер луговой – при урожае 100–140 ц/га оставляют в почве после укоса до 200 кг азота на 1 га, т.е. на 100–120 кг/га больше, чем сами используют из почвы за вегетацию.

Причина этой "биологической нецелесообразности" использования ими азота – различие эволюционно-генетических задач видов. Все однолетние культуры заканчивают онтогенез осенью первого года. Многолетние же должны обеспечить себя элементами питания для перезимовки и весеннего отрастания. Азота в корнях люцерны 2–3-го года жизни перед уходом в зиму до 1,5%, т.е. до 120–130 кг/га; запахивая такие растительные остатки, мы передаем его другим культурам. Этого количества азота за время последействия хватит на прибавку 20–30 ц урожая зерна пшеницы.

Мы полагаем, что посевы многолетних бобовых с урожайностью сена 50–60 ц/га используют около 70–80 кг азота на 1 га, а оставляют с корневыми и пожнивными остатками 100–120 кг/га, т.е. обогащают почву на 30–40 кг азота на 1 га. Посевы клевера с урожайностью 20–30 ц/га сена обогащают почву азотом на 15–20 кг/га, поэтому следует обосновать оптимальную структуру севооборотов с бобовыми в целях сохранения плодородия почвы и повышения урожайности культур при минимальном использовании минеральных удобрений.

Существенна эффективность инокуляции, недостаточность которой нередко объясняется производством инокулятов на базе старых малоактивных штаммов, которые эффективны лишь при первичной интродукции бобовых в районы, где в фитоценозах не было видов данного рода, или в случае глубокой химической мелиорации почв, например, со сдвигом рН с 3,8 до 6,3.

Нами в 1981 г. создана модель северного экотипа сои с большим активным симбиотическим аппаратом, с которой ведут опыты лаборатория растениеводства ТСХА, Рязанская СХОС, Калужский филиал ТСХА. Получены формы для сортоиспытания. Разработана также модель сорта небуреющей тарелочной чечевицы с активным симбиотическим аппаратом и передана в сортоиспытание. Начата селекция донника, люцерны и клевера ползучего. Есть успехи селекции люцерны на повышенную азотфиксацию и в Ставропольском НИИСХ.

Нам представляются основными следующие направления исследований симбиотической азотфиксации: 1) определение параметров основных факторов среды, оптимальных для реализации потенциальной симбиотической азотфикссирующей активности; 2) создание видоспецифических вирулентных активных, экологически приспособленных штаммов клубеньковых бактерий и разработка приемов их применения; 3) селекция сортов бобовых культур на повышенную симбиотическую активность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Мишустин Е.Н., Шильникова В.К. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. М.: Наука, 1973. 287 с.

Посыпанов С.Г. Белковая продукция бобовых культур при симбиотрофном и автотрофном типах питания азотом: Автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. Л., 1983. 50 с.

Трепачев Е.П. Значение биологического и минерального азота в проблеме белка // Минеральный и биологический азот в земледелии СССР. М.: Наука, 1985. С. 27–37.

РЕГУЛЯЦИЯ ЧИСЛЕННОСТИ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ В ПОЧВЕ

Д.Г. Звягинцев, П.А. Кожевин, М.Е. Додзин, Л.М. Полянская

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Актуальность решения прикладных задач, связанных с контролем *in situ* численности конкретных микробных популяций как полезных (например, бактериальные удобрения), так и вредных (фитопатогены, микробное загрязнение), очевидна. В частности, не решен до конца вопрос обеспечения такой численности клубеньковых бактерий в почве, при которой в полной мере реализуется взаимодействие с растением-хозяином. Поскольку инфицирование растений происходит в определенном интервале времени, эффективность искусственной бактериализации при прочих равных условиях зависит от возможности обеспечения необходимого для инокуляции количества клеток ризобий к заданному моменту.

Для решения задач по регуляции их численности имеет принципиальное значение способность клубеньковых бактерий к активному существованию в нестерильной почве. Из динамического характера популяционного равновесия [Звягинцев, Кожевин, 1974; Кожевин, 1976] вытекает возможность сдвига процесса в нужном направлении. Зная место клубеньковых бактерий в микробной системе, можно более целенаправленно воздействовать на объект [Кожевин, 1985].

Повышения численности клубеньковых бактерий можно добиться различными воздействиями, и в том числе внесением в почву легкодоступных ресурсов (мономеров), например глюкозы [Звягинцев, Кожевин, 1974]. Аналогичный эффект наблюдается и во всех других случаях, когда в местообитании создаются условия "молодой" системы с относительно высоким темпом размножения. Примером могут служить не только варианты с внесением в почву субстрата, но и с простым увлажнением воздушно-сухих образцов, когда развитие осуществляется за счет пула легкодоступных почвенных ресурсов [Полянская и др., 1981; Звягинцев и др., 1981]. Такие приемы, как правило, позволяют увеличить численность ризобий не более чем в 5–7 раз, причем максимальный эффект регистрируется в течение относительно короткого промежутка времени (около недели). Указанные ограничения связаны с тем, что основная часть источников энергии и углерода потребляется почвенными микроорганизмами [Кожевин и др., 1980], активизируются механизмы антибиоза и конкуренции, эффект стимуляции клубеньковых бактерий постепенно исчезает.

Другой способ воздействия на численность популяции — внесение полимеров для активации почвенных гидролитиков и увеличения потока мономеров. Внесение в почву полимера и одновременно партнера-гидролитика также позволяет повышать численность ризобий. В обоих случаях эффект в полной мере проявляется не сразу, а спустя определенное время (более недели), но оказывается более стабильным. Фактически при этом удается повысить численность бактерий в 10–30 раз [Лимарь и др., 1984; Лисичкина, Кожевин, 1986; Полянская и др., 1984].

Имеющаяся информация об экологии клубеньковых бактерий и приемах популяционного подхода позволяет перейти к оптимизации (максимизации) численности популяции *in situ*.

Цель настоящей работы состояла в изучении возможности обеспечения в нестерильном местообитании максимального числа клубеньковых бактерий к определенному моменту времени. Для выбора оптимальных воздействий применяли методику математического планирования эксперимента.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Изучали возможность регуляции численности культуры *Rhizobium leguminosarum* шт. ZK в черноземе и дерново-подзолистой почве в широком диапазоне исходных значений (10^3 – 10^7 кл/г почвы), при разной длительности нахождения клеток в почве (воздействие на популяцию сразу или спустя месяц после внесения ризобий в почву).

Количественный учет клубеньковых бактерий обеспечивался генетической маркировкой (стрептомициноустойчивость), добавлением в бобовый агар стрептомицина (1 г/л среды) и кристаллического фиолетового (2 мг/л среды).

С целью регуляции численности клубеньковых бактерий вносили в почву глюкозу (фактор воздействия X_1), стрептомицин (X_2), варьировали длительность пребывания клеток в почве после внесения факторов X_1 и X_2 (фактор времени X_3).

Почву просеивали через сито 2 мм, переносили в чашки Петри (20 г на чашку) и вносили туда суспензию клубеньковых бактерий, раствор глюкозы и стрептомицина (либо одновременно, либо через месяц после внесения ризобий); затем почву тщательно перемешивали. Чашки помещали в экспиратор и хранили при комнатной температуре и постоянной влажности.

Поиск оптимальных решений производили в соответствии с методикой математического планирования эксперимента, реализуя "полный факторный эксперимент" (ПФЭ) и "крутое восхождение", применявшиеся ранее только для работы с чистыми культурами в контролируемых условиях [Максимов, 1981; Максимов, Федоров, 1969]. Дозы глюкозы и стрептомицина определялись схемой постановки ПФЭ и "крутоого восхождения".

ПФЭ-2³ – первый этап оптимизационной работы, цель его – построение математической регрессионной модели отклика популяции на воздействие факторами X_1 , X_2 , X_3 . В эксперименте реализуется воздействие всеми возможными сочетаниями трех факторов, каждый из которых берется на двух уровнях (табл. 1), т.е. 8 вариантов воздействия. Зависимость популяционной плотности Y от величин воздействующих факторов описывали уравнением регрессии $Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3 + b_{123} X_1 X_2 X_3$. Коэффициенты при X_i – коэффициенты регрессии (b_i), отражающие степень влияния факторов на численности клеток, рассчитывали по результатам ПФЭ. Такие члены уравнения, как $b_{ij} X_i X_j$, показывают эффект действия на популяцию взаимодействующих факторов.

"Крутое восхождение" – собственно этап оптимизации заданного параметра. Основой для достижения конечного результата – нахождения оптимального (в заданных условиях) сочетания величин воздействующих факторов, т.е. для решения оптимизационной задачи, – служит уравнение рег-

Таблица 1

Схема постановки ПФЭ-2³ (в условных единицах)

Вариант		Фактор		
№№	Условное обозначение	Глюкоза X_1	Стрептомицин X_2	Время X_3
1	"1"	—	—	—
2	X_1	+	—	—
3	X_2	—	+	—
4	$X_1 X_2$	+	+	—
5	X_3	—	—	+
6	$X_1 X_3$	+	—	+
7	$X_2 X_3$	—	+	+
8	$X_1 X_2 X_3$	+	+	+
9	контроль	0	0	0

Примечание. "Матрица планирования" эксперимента ~

Уровень факторов в условных переменных	X_1 , мг/20 г почвы	X_2 , мг/20 г почвы	X_3 , сут
"—" (нижний уровень фактора)	20	5	3
"+" (верхний уровень фактора)	140	195	9
"0" (основной уровень фактора)	80	100	6

рессии. В серии вариантов с определенным шагом последовательно увеличивали или уменьшали дозы внесения в почву тех факторов, коэффициенты при которых в уравнении регрессии были соответственно положительными или отрицательными. Базисный уровень факторов, с которого начинается "крутое восхождение", равен основному уровню ПФЭ.

Статистическую обработку результатов проводили по стандартной методике [Ашмарин и др., 1975].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для регуляции численности ризобиот были выбраны следующие факторы: глюкоза (X_1), стрептомицин (X_2), время (X_3). Значимость влияния времени на популяционную плотность очевидна [Полянская, 1985]. Целесообразность внесения в почву глюкозы (легкодоступного мономера) связана с отмеченным в литературе положительным эффектом. Внесение же в почву стрептомицина предположительно должно было повысить численность клубеньковых бактерий за счет подавления роста почвенных микробов-антагонистов и конкурентов.

Ни в одном из контрольных вариантов (без внесения глюкозы и стреп-

Отклик популяции на воздействие в различных вариантах "крутого восхождения"

N — популяционная плотность, кл/г, почвы; K — номер варианта "крутого восхождения"

томицина) не было зафиксировано увеличение численности клубеньковых бактерий как с уровня внесения, так и с уровня стабилизации. Принципиально иная картина наблюдалась после воздействия факторами X_1 и X_2 .

Одновременное внесение в чернозем культуры *R. leguminosarum* (10^5 — 10^7 кл/г почвы) и оптимальных (по результатам "крутого восхождения") доз глюкозы и стрептомицина приводило к примерно 100-кратной прибавке численности с уровня внесения 10^5 кл/г почвы, 10-кратной — с уровня 10^7 кл/г почвы к 14-м суткам.

Оказалось возможным целенаправленное повышение обилия клубеньковых бактерий и после их длительного пребывания в почве. В лучшем варианте "крутого восхождения" уже к 3-м суткам с момента внесения в чернозем глюкозы и стрептомицина отмечалась 150-кратная прибавка численности популяции с уровня стабилизации $6 \cdot 10^5$ кл/г почвы (см. рисунок).

Оставался открытым вопрос о возможности значительного повышения численности популяции, чей уровень внесения или стабилизации не превышает 10^4 кл/г почвы. Для проверки реальности решения указанной задачи вносили культуру *R. leguminosarum* в образцы дерново-подзолистой почвы в количестве 10^2 — 10^4 кл/г почвы (табл. 2). Минимальный уровень внесения был столь низок, что из почвенных образцов ни сразу, ни спустя месяц после внесения не удавалось выделить исследуемый штамм методом посева.

Внесение глюкозы и стрептомицина приводило к резкому возрастанию численности клубеньковых бактерий. В лучших вариантах ПФЭ удавалось достичь 50-кратного подъема численности ризобий с уровня внесения 10^3 кл/г почвы к 3-м суткам с момента воздействия, 80-кратного — с уровня внесения 10^4 кл/г почвы к 12-м суткам с момента воздействия (табл. 2); 195-кратного — с уровня стабилизации 10^3 кл/г почвы к 12-м суткам со дня воздействия (табл. 3). На основе результатов ПФЭ были рассчитаны уравнения регрессии (табл. 2, 3), исходя из которых планировались схемы проведения "крутого восхождения". Результатом постановки "крутого восхождения", в ходе которого отмечались более высокие по сравнению с ПФЭ эффекты от воздействий, стало нахождение искомых оптимальных решений.

Примечательно, что в ряде случаев достижение более высокого уровня популяционной плотности клубеньковых бактерий обеспечивалось при бо-

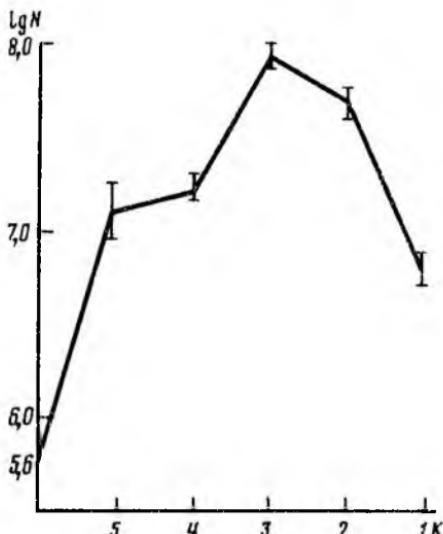


Таблица 2

Результаты факторных экспериментов, реализованных одновременно с внесением в дерново-подзолистую почву клубеньковых бактерий

Тип эксперимента	Популяционная плотность		Величина воздействующего фактора			Эффект от воздействия $A_2 : A_1$
	до воздействия (уровень внесения) A_1 , кл/г почвы	после воздействия на X_3 -сутки A_2 , кл/г почвы	Глюкоза X_1 , мг/г почвы	Стрептомицин X_2 , мг/г почвы	Время X_3 , сут	
ПФЭ-2 ³	10^3	$48 \cdot 10^3$	1,0	9,50	3	48
	10^4	$79 \cdot 10^4$	1,0	9,50	12	79
"Крутое восхождение"	10^2	$700 \cdot 10^2$	4,0	7,37	7	700
	10^2	$1100 \cdot 10^2$	2,5	7,37	9	1100
	10^2	$1600 \cdot 10^2$	0,5	9,60	13	1600

Примечание. Уравнения регрессии для 2 уровней внесения популяции в почву:
 $Y = (37 - 8X_1 + 17X_2 - 22X_3 - 11X_1X_2 - 4X_1X_3 - 6X_2X_3 - 2X_1X_2X_3) \times 10^3$;
 $Y = (20 - 14X_1 + 8X_2 + 11X_3 - 3X_1X_2 - 6X_1X_3 + 10X_2X_3 - 7X_1X_2X_3) \times 10^4$

Таблица 3

Результаты факторных экспериментов, реализованных через месяц после внесения в дерново-подзолистую почву клубеньковых бактерий

Тип эксперимента	Популяционная плотность		Величины воздействующих факторов			Эффект от воздействия $A_2 : A_1$
	до воздействия (уровень стабилизации) A_1 , кл/г почвы	после воздействия на X_3 -сутки A_2 , кл/г почвы	Глюкоза X_1 , мг/г почвы	Стрептомицин X_2 , мг/г почвы	Время X_3 , сут	
ПФЭ-2 ³	$1,3 \cdot 10^3$	$88 \cdot 10^3$	7	9,75	12	68
	$1,3 \cdot 10^3$	$173 \cdot 10^3$	1	9,75	6	133
	$1,3 \cdot 10^3$	$254 \cdot 10^3$	4	9,75	12	195
"Крутое восхождение"	$1,3 \cdot 10^4$	$263 \cdot 10^4$	2,5	8,50	12	202
	$1,3 \cdot 10^4$	$955 \cdot 10^4$	2,5	9,50	14	762
	$1,3 \cdot 10^4$	$191 \cdot 10^4$	2,5	7,50	10	147
	10^2	$5000 \cdot 10^2$	2,5	9,00	12	5000

Примечание. Уравнение регрессии: $Y = (9 + 0,5X_1 + 3,7X_2 + 4,8X_3 + 3,7X_1X_3 + 5,0X_1X_2X_3) \times 10^4$.

лее экономном расходовании глюкозы и стрептомицина. Эффективность же воздействий была чрезвычайно высокой, отмечался так называемый "популяционный взрыв", сравнимый с ростом клубеньковых бактерий на глюкозе в чистой культуре. При исходном количестве около 10^2 кл/г почвы к 10-м суткам с момента внесения в почву глюкозы и стрептомицина в оптимальных дозах наблюдали более чем 1600-кратное возрастание численности с уровня внесения, 5000-кратное — с уровня стабилизации (табл. 2,3). Таким образом, удавалось повысить численность клубеньковых бактерий практически с "уровня отмирания" (около 10^2 кл/г почвы) до уровня, способного обеспечить инфицирование бобового растения (10^5 — 10^6 кл/г почвы). Такая возможность весьма важна в случае наличия в почве на низком, недостаточном для инфицирования уровне численности активного, вирулентного и эффективного штамма, ранее внесенного в почву.

Итак, с применением математического планирования эксперимента удалось решить конкретную оптимизационную задачу — добиться значительно-го повышения к заданному моменту времени высокой популяционной плотности конкретного штамма клубеньковых бактерий, что необходимо для успешной инокуляции. Поэтому настоящая работа может рассматриваться как шаг к повышению эффективности использования клубенько-вых бактерий в качестве бактериальных удобрений. Установленная прин-ципиальная возможность значительного увеличения обилия малочисленных популяций представляет интерес и как методическое решение при выделе-нии клубеньковых бактерий из почвы.

Данные подходы можно использовать и в более простых ситуациях: для подъема численности клубеньковых бактерий в случае снижения титра клеток при хранении ризоторфина (непосредственно перед использованием удобрения). Как следует из представленных данных, такой результат мо-жет быть достигнут и в нестерильной среде за счет целенаправленного ис-пользования межмикробных взаимодействий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ашмарин И.П., Васильев Н.Н., Амбросов В.А. Быстрые методы статистической об-работки и планирования экспериментов. Л.: Изд-во ЛГУ, 1975. 78 с.

Звягинцев Д.Г., Кожевин П.А. Изучение динамики популяции *R.leguminosarum* с помощью иммунофлуоресценции // Микробиология. 1974. Т. 43, вып. 5. С. 888—891.

Звягинцев Д.Г., Кожевин П.А., Кочкина Г.А., Полянская Л.М. Микробная сукцес-сия в почве и определение экологических стратегий конкретных популяций // Там же. 1981. Т. 50, вып. 2. С. 353—359.

Кожевин П.А. Люминесцентно-микробиологический метод изучения микроорганиз-мов и отдельных микробных популяций в почве: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1976. 24 с.

Кожевин П.А. Экология микроорганизмов: эксперименты в природе // Природа. 1985. № 7. С. 78—85.

Кожевин П.А., Кочкина Г.А., Ягодина Т.А., Звягинцев Д.Г. О критериях микробной сукцессии в почве // Микробиология. 1980. Т. 49, вып. 2. С. 335—341.

Лимарь Т.Е., Полянская Л.М., Кожевин П.А., Звягинцев Д.Г. Приемы повышения численности клубеньковых бактерий в почве // Там же. 1984. Т. 53, вып. 5. С. 830—832.

Лисичкина Г.А., Кожевин П.А. Динамика численности вирулентного и авирулент-ного штаммов *Rhizobium japonicum* в ризоплане и ризосфере сои // Там же. 1986. Т. 55, вып. 1. С. 138—141.

Максимов В.Н. Многофакторный эксперимент в биологии. М.: Изд-во МГУ, 1981. 227 с.

Максимов В.Н., Федоров В.Д. Применение методов математического планирования эксперимента при отыскании оптимальных условий культивирования микроорганизмов. М.: Изд-во МГУ, 1969. 134 с.

Полянская Л.М. Влияние актиномицетов на выживание клубеньковых бактерий в почве // Микробиология. 1985. Т. 54, вып. 2. С. 314–317.

Полянская Л.М., Кожевин П.А., Звягинцев Д.Г. Зависимость динамики численности клубеньковых бактерий в почве от стадий микробной сукцессии // Там же. 1981. Т. 50, вып. 1. С. 183–186.

Полянская Л.М., Кожевин П.А., Звягинцев Д.Г. Стимуляция и элиминирование клубеньковых бактерий при внесении актиномицетов и хитина // Там же. 1984. Т. 53, вып. 6. С. 1012–1014.

УДК 57.082.222 + 631.46

ПРОЦЕСС ИНФИЦИРОВАНИЯ БОБОВОГО РАСТЕНИЯ КЛУБЕНЬКОВЫМИ БАКТЕРИЯМИ

В.К. Шильникова

Московская сельскохозяйственная академия им. К.А. Тимирязева

Вопрос о биологической целесообразности бобово-ризобиального симбиоза как экологически выраженной эволюционно сформировавшейся системе очень важен, поскольку внедрение ризобий завершается не только симбиозом. Если растения клевера поместить в темноту, ризобии тут же переключаются на паразитический способ существования. Однако эволюция все же шла, очевидно, в направлении симбиоза, а не паразитизма. По мнению Л. Маргелис [1983], партнеры приходят друг к другу на помочь в поисках пищи.

Бобово-ризобиальная система формируется тогда, когда ризобии проникают в корень растения-хозяина. Клубенек бобового растения – это качественно новая биологическая система. В клубеньке ризобии проводят меньшую часть времени, чем в почве. Реакция каждого из партнеров симбиоза в клубеньке имеет адаптивный характер, определяемый генетическими факторами и конкретными условиями.

В инфицированном растении между хозяином и микросимбионтом происходит постоянный обмен метаболитами – гормонами, коферментами и прочими соединениями. Метаболиты каждого из партнеров могут подавлять или стимулировать определенные звенья обмена веществ, выступать в роли репрессоров и дерепрессоров биосинтеза белковых соединений, в том числе ферментов, создавая условия для их синтеза *de novo*. В результате подобного взаимодействия микросимбионт вызывает существенную перестройку метаболизма растений. В ходе сопряженной эволюции микро- и макропарнера симбиоза изменения метаболизма микроорганизмов закрепляются генетически, и это приводит к появлению новых рас ризобий. Бессспорно, эволюция клубеньковых бактерий идет и сейчас. Не исключено, что симбиоз *Parasponia* (сем. *Ulmaceae*) с ризобиями, в клубеньках которых нет леггемоглобина, – результат подобной эволюции.

На клубеньковые бактерии почва действует совершенно иным образом, чем ткань растения. В почве ризобии вынуждены существовать значительно большую часть жизни. Двойственное существование, естественно, определяет их биологию. Причем в приспособляемости ризобий к различным условиям — почве, как определенной экологической среде обитания, и к ткани растения-хозяина — должен проявляться общебиологический смысл, т.е. приспособливаясь к одной среде, они утрачивают черты приспособляемости к другой. Но в связи с этим физиологические детерминанты их специфичности, вирулентности и других свойств в отношении растений могут отсутствовать или быть сильно ослаблены. К сожалению, поскольку вопрос о принадлежности клубеньковых бактерий к роду *Rhizobium* можно решить только после инокуляции растения-хозяина, очевидно, многие формы ризобий, стоящие на разных ступенях эволюционной приспособляемости к растению, не учитываются. Надо думать, что в природе есть свободноживущие ризобии и, возможно, недоучитывается их роль в азотном балансе почвы.

Выяснение степени родства ризобий с почвенными и ризосферными бактериями, несомненно, должно способствовать решению проблемы переноса генов азотфиксации. Пока мы можем только говорить о том, что ризобии, возможно, происходят из различных групп почвенных бактерий, из представителей эпифитных, в частности ризосферных бактерий. Поскольку они тесно связаны с агробактериями, путь передачи *nif*-гена растениям через стадию конструирования опухолевых клеток у растений с помощью агробактерий наиболее успешно сейчас реализуется. В этом отношении представляет интерес выделение из стеблевых клубеньков бобового растения сесбании свободноживущей клубеньковой бактерии, рассматриваемой как классическая форма клебсиеллы [Dreifus, Dommergues, 1981].

Становление бобово-ризобиальной системы, поддержание ее стабильности и способы регуляции имеют большое значение. Однако точное определение этой системы сделать трудно, поскольку нет четких границ взаимосвязей макро- и микропартнеров и симбиотические отношения легко переходят в паразитические. Бобово-ризобиальный симбиоз — это результат интеграции ранее независимых партнеров. Целое здесь нечто гораздо большее, чем сумма частей.

Какие основные черты характерны для данной системы?

Во-первых, взаимоотношения складываются между популяциями различных видов — представителями эукариот (растений) и прокариот (бактерий). Это как бы вид особой патогенной ситуации [Selye, 1956]. В среднем, клетка клубенька имеет в диаметре 30–50 мкм, в клубеньке размерами 3–5 мм умещается примерно 100 слоев клеток, что составляет всего 10000 клеток. В каждой инфицированной растительной клетке (а клетки инфицированы не все) умещается приблизительно 1000 клеток ризобий, в одном клубеньке около 10 миллионов, а если взять на одно растение, то это уже составит примерно 1 млрд клеток ризобий. Если же будем считывать для клубенька сои, то численность приблизится к 10–30 млрд клеток. Такова обычно инфекционная нагрузка на одно растение, регулируемая в онтогенезе растением-хозяином. Один миллиард прокариотных клеток на одну эукариотную. Ризобии в онтогенезе растения отмирают.

Трудно сказать, как в растении обезвреживаются продукты лизиса отмерших клеток ризобий, поскольку процесс отмирания бактерий идет непрерывно даже в неотмирающих тканях клубенька. Не исключено, что в зоне бактероидов фитолизосомы лизируют бактероиды и клетки растения-хозяина с помощью гидролаз [Truchet, Coulomb, 1973]. Вступление в контакт симбионтов зависит от местаобитания эукариот и конкретных экологических условий.

Во-вторых, партнеры зависят друг от друга физиологически только в экстремальных для них условиях существования. Для растения – это отсутствие источника питания – азота, для бактерий – питания и энергии. Если условия для них не экстремальны, они обходятся друг без друга.

В-третьих, рассматриваемая система устойчива, что проявляется через реакции растения и микроорганизма. Это подтверждается тем, что само развитие клубенька как своеобразной опухоли – защитная реакция растения, которое с помощью ингибитинов или прогибитинов противодействует системному распространению ризобий во всех тканях. Регуляция численности ризобий в тканях тоже определяется хозяином. В свою очередь, микроорганизм способен противостоять защитной реакции растения-хозяина, более того, может даже подавлять его развитие при превышении инфекционной нагрузки. Особенно четко это проявляется в культуре ткани, когда эукариот под влиянием большого числа клеток ризобий может даже погибнуть. Но в целом система в процессе эволюции формировалась как единая, поскольку шел отбор на создание регулирующего механизма, приведшего в конечном итоге к гармоничным взаимосвязям.

В-четвертых, высокая степень размножения микропартнера, что компенсирует его гибель в тканях хозяина и в почве. Наличие сапрофитных свободноживущих "стадий" в почве создает дополнительную проблему не только для практики сельского хозяйства, но и для ризобий, поскольку им приходится приспособливаться к двум совершенно несходным комплексам условий. Очевидно, именно последнее обуславливает появление в их жизненном цикле неактивных покоящихся форм типа аграспор и таких биологически целесообразных форм, как L-формы. По-видимому, наличие разнообразных форм в цикле развития является одним из вариантов биологической реакции бактерий, способствующих выживанию и сохранению вида в условиях действия физических, химических и биологических факторов, проявлению их экологической пластичности.

Биотический потенциал ризобий очень высок. В лабораторных условиях на среде с маннитом при аэрации ризобии размножаются за 20–35 мин, почти такая же скорость размножения наблюдается в природных условиях вблизи семени растения-хозяина, в инфекционных нитях, при высвобождении в цитоплазму клетки хозяина из нитей скорость колеблется в пределах 20–40 мин, а затем при распространении по клеткам растения довольно резко снижается. Однако и на этих стадиях в целом биотический потенциал высок за счет имеющихся в онтогенезе процессов развития ризобий, таких, как почкование, фрагментация. Исключительная эволюционная пластичность ризобий определила их способность осваивать разнообразные зоны обитания, и что особенно важно, своеобразную и сравнительно обособленную сферу существования – клубенек.

Ни одна из указанных черт не может быть постоянной – существование

симбиоза зависит и от времени года, и от ряда эколого-географических условий.

По мнению Бэрнса и Харди [Burns, Hardy, 1975], бобово-ризобиальный симбиоз должен квалифицироваться как облигатный. Однако нельзя не принимать во внимание при этом, что партнеры могут самостоятельно существовать в природе, а ризобии проводят в почве как сапрофиты даже большую часть жизни. Поэтому, возможно, правильнее называть данный тип сожительства протокооперацией, т.е. необлигатным сосуществованием [Руссель, 1977].

Для понимания последовательности событий, ведущих к развитию клубенька, необходимо знание природных (в том числе и химических) компонентов – индукторов таких изменений, на основе которых становится возможным выявление первоначальных пусковых механизмов инокуляционного процесса.

Процесс инфицирования растения ризобиями проходит несколько этапов. Первый этап – предынфекционный контакт микропартнера и растения. Этот контакт происходит при интраптерральном, фитохорном или гидрохорном распространении ризобий. Все эти пути чаще всего пассивные. На этом этапе ризобии размножаются в ризосфере растений до определенной критической концентрации, при которой достигается норма заражаемости. Норма для одного и того же штамма не постоянна, зависит от растения и внешних условий. Размножение ризобий в ризосфере и ризоплане не специфично. Они размножаются в ризоплане различных видов растений, не только бобовых. Так, из ризопланы люцерны или даже небобового растения можно выделить клубеньковые бактерии сои и, напротив, из ризопланы сои какие-то иные ризобии. Это в определенной степени доказывает, что у ризобий возможны промежуточные хозяева и что они могут происходить от сапрофитных почвенных микроорганизмов, приобретающих черты специфичности.

Процесс инфицирования в принципе может быть запущен одной-единственной клеткой ризобий, о чем свидетельствуют результаты лабораторных стерильных опытов. Это не означает, что в ткань проникает одна клетка. Очевидно, она обеспечивает множественное потомство и вызывает индукцию клубенька. В полевых условиях рекомендуется вносить сразу относительно большие количества клубеньковых бактерий на семя – приблизительно 10^5 – 10^7 . Именно такое количество, очевидно, служит критической концентрацией, обеспечивающей инокуляцию. Необходимость высокой численности определяется физиологическим состоянием популяции, степенью вирулентности клеток, их жизнеспособностью и другими причинами. Как только начинает происходить внедрение ризобий в ткань корня, численность их в ризосфере и ризоплане снижается на 2–3 порядка. На этапе предынфекционного контакта ризобии обычно локализуются вблизи корневых волосков, не вызывая их видимого изменения.

Следующий этап – этап первичного взаимодействия растения-хозяина и микросимбионта – узнавание растения-хозяина. Эта стадия неясна. Ее расшифровка – ключ к пониманию природы специфичности. Наиболее перспективные исследования в этом плане ведутся по выяснению комплементарности – взаимодействия поверхностей на уровне биополимеров, а именно на уровне углеводно-белкового узнавания. Лектины (белко-

вые и гликопротеидные соединения) содержатся на корнях более 600 видов бобовых растений. Они способны связываться с полисахаридами, гликопротеидами и другими углеводсодержащими соединениями клеточных поверхностей ризобий.

По существу, углеводсодержащие полимеры ризобий выполняют роль рецепторов лектинов. Пока мало исследований в этом направлении. Этап узнавания специфичен. Он сопровождается как специфическим искривлением корневых волосков, так и неспецифическим: под влиянием ИУК, агробактерий и даже механических повреждений при росте корня. Однако специфическое искривление корневых волосков всегда узнаваемо: волосок приобретает форму ручки зонтика. Если еще недавно считали, что у сои и люпина специфически искривленных волосков нет, то сейчас этот факт доказан [Ranga, Keister, 1978; Turgenev, Bauer, 1982]. Искривление происходит в течение 12 ч после инокуляции. Причем специфически искривляются только очень короткие (25–80 мкм) корневые волоски, а зрелые, длинные (500–800 мкм) специфически не искривляются. Аналогичные данные получены нами в опытах с клевером.

Специфическому искривлению подвергаются всего 2% корневых волосков, более того, из них только около одной пятой образуют клубеньки. На этом этапе, если ризобии обладают пектинолитической активностью, происходит их воздействие на пектиновые вещества. Возможно, пектинолитическая активность – одно из проявлений вирулентности. В отношении пектинолитической активности ризобий данные весьма спорны. Существует мнение, что пектинолитической активностью обладают ризобии, а целлюлолитической – растения [Hubbell et al., 1978], а также, что пектинолитическая активность бактероидов в 4–5 раз выше, чем ризобий в чистой культуре. Во всяком случае, если пектинолитическая активность способствует внедрению ризобий [Verma, Zobgi, 1978], следует учитывать, что ею могут обладать и сопутствующие ризобиям почвенные бактерии [Рудаков, Биркель, 1954].

Третий этап – внедрение ризобий в ткань растения-хозяина. На этом этапе действует множество барьеров устойчивости растения. В частности, клеточная стенка и мембрана растения-хозяина вырабатывают не только привлекающие вещества, но и служат избирательным барьером, препятствующим процессу инфицирования. На этом этапе реализуется вирулентность ризобий. Вирулентность – это потенциальная способность вызывать инфицирование растения-хозяина, это генетический признак, атрибут вида, возникший в процессе эволюции симбиотрофных взаимоотношений. Степень реализации этого свойства зависит от ряда условий, в первую очередь – от возможности контакта с растением-хозяином. Без контакта способность вызвать инфекционный процесс остается потенциальным, нереализованным свойством ризобий.

Вирулентность возникла в связи с освоением и заселением ризобиями новой среды обитания (помимо почвы) – организма растения-хозяина. Среда макроорганизма стала тем селективным агентом, который оказал решающее действие на формирование вирулентных штаммов ризобий. Возникновение вирулентности прежде всего сопряжено с приобретением способности преодолевать защитные барьеры растения. Смысл, вкладываемый в понятие вирулентности, подчеркивает количественный характер

этого показателя, степень его реализации или меру его проявления с учетом конкретных условий, при которых совершается инфекционный процесс. Характеристика штамма по вирулентности учитывает особенности макро- и микросимбионтов и отражает конечный результат заражения растений.

Внедрение происходит быстро. За 36–40 ч инфекционные нити индуцируют образование первичного клубенька. Скорость движения инфекционной нити 5–10 мкм/ч, корневой волосок ризобии проходит за 5–10 ч. Обычно внедрение ризобий в ткань первичного клубенька завершается за 4–5 сут. Среди инфекционных нитей 10–80% составляют abortивные. Это местные защитные барьеры эукариотного организма, причем abortировать инфекционные нити растения могут на любой стадии инфекционного процесса. Распространяются инфекционные нити подобно грибной инфекции. Механизм проникновения в клетки не совсем ясен. Наиболее вероятным представляется структурное связывание нити со стенкой, благодаря росту и инвагинации цитоплазматической мембранны каждой следующей клетки коры [Яковлева, 1975]. Не вызывает сомнения и пассивный путь распространения ризобий при делении клеток растения [Miloovidov, 1928].

Итак, от момента инокуляции до внедрения и начала распространения по ткани корня проходит 3–5 сут. В почве, однако, факторы среды могут задержать этот процесс.

Далее в инфицированной ткани растения происходит процесс превращения в бактероиды. Бактероидной зоной, где преобладают только одни бактероиды, считается лишь центральная часть клубенька. В других зонах наряду с бактероидами существуют и палочки. Бактероиды осуществляют процесс азотфиксации. Эта фракция наиболее удобна для изучения симбиотических свойств клубеньковых бактерий. К концу вегетационного периода развития растения начинается дегенерация бактероидов, завершающаяся образованием артроспор.

В заключение следует отметить, что эффективность бобово-ризобиального симбиоза зависит не только от биологических, но и абиотических факторов. Симбиоз, характеризующийся сложностью внутренних взаимодействий, отличается относительно быстрыми ответными реакциями на внешние воздействия на первых этапах становления. Сформировавшаяся же система довольно устойчива и может эффективно функционировать даже в неблагоприятных экологических условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Маргелис Л. Роль симбиоза в эволюции клетки. М.: Мир, 1983. 351 с.

Рудаков К.И., Биркель М.Р. Образование клубеньков и протоплектинальные бактерии // Тр. Ин-та микробиологии АН СССР. 1954. Вып. 3. С. 125–143.

Руссель С. Микроорганизмы и жизнь почвы, М.: Колос, 1977. 223 с.

Яковлева З.М. Бактероиды клубеньковых бактерий. Новосибирск: Наука, 1975. 171 с.

Burns R., Hardy R. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Berlin: Springer, 1975. 189 p.

Dreifus B., Dommergues Y. Stem nodules on the tropical legume *Sesbania rostrata* // Current perspective nitrogen fixation. Canberra: Wiley Interscience, 1981. P. 471.

Hubbell D., Morales V., Umalis-Carsia M. Pectolytic enzymes in *Rhizobium* // Appl. Environ. Microbiol. 1978. Vol. 35. P. 210–213.

Milovidov P. Recherches sur les tubercules de lupin // Rev. gen. bot. 1928. Vol. 40. P. 193–205.

Ranga Rao V., Keister D. Infection threads in the root hairs of soybean inoculated with *Rhizobium japonicum* // Protoplasma. 1978. Vol. 97. P. 311–316.

Selye H. The stress of life. N.Y.; Toronto; L.: McGraw-Hill, 1956. 324 p.

Truchet G., Coulomb P.H. Mice en evidence et evolution de systeme phytolysosomal // J. Ultrastruct. Res. 1973. Vol. 43. P. 36–57.

Turgeon B., Bauer W. Early events in the infection of soybean by *Rhizobium japonicum* // Canad. J. Bot. 1982. Vol. 60. P. 152–161.

Verma D., Zobgy V., Bal A. Cooperative action of the plant and *Rhizobium* // Plant Sci. Lett. 1978. Vol. 13. P. 137–142.

УДК 581 : 133.11 : 581.138.1 : 582.736

СИМБИОТИЧЕСКАЯ АЗОТФИКСАЦИЯ В НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ УСЛОВИЯХ

Г.Я. Жизневская, Е.Э. Федорова

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, Москва

Задачей физиологии растений при исследовании проблемы биологической азотфиксации является изучение роли высшего растения в формировании и функционировании азотфикссирующего симбиоза, выявление общих и специфических реакций бобового растения на изменение условий внешней среды. Условия минерального питания, освещенности, влагообеспеченности оказывают существенное влияние на уровень азотфикссирующей активности клубеньков.

В работах, выполненных на клевере красном [Посыпанов, Воронкова 1981; Човжик, Трепачев, 1982], показано, что внесение азотных удобрений в высоких дозах не давало прибавки урожая и снижало азотфикссирующую активность клубеньков. Связанный азот ингибирует практически все стадии образования и функционирования азотфикссирующей системы. Так, нарушался процесс взаимодействия трифолиана (лектина клевера) с поверхностью *R. trifolii* [Dazzo, Brill, 1978], уменьшалась масса клубеньков гороха и снижалась скорость их роста [Lie et al., 1976].

С другой стороны, такой фактор, как избыточное увлажнение, приводил к образованию чрезвычайно большого количества клубеньков на корнях клевера [Федорова, 1987]. В условиях избыточного увлажнения в клубеньках гороха нарушался синтез нитрогеназы бактериоидов [Bisseling et al., 1980].

При недостатке влаги у растений сои в фазах бутонизации и цветения активность нитрогеназы в клубеньках снижалась на 75% в условиях кратковременного водного стресса [Желюк и др., 1985]. По мнению Спрент [Sprent, Gallacher, 1975], основной причиной падения азотфикссирующей активности в клубеньках сои при недостаточном увлажнении является ингибирование дыхания бактериоидов вследствие нарушения газообмена между внутренними и внешними частями клубенька. При увеличении степени недостатка влаги у клубеньков сои наблюдалось снижение ацети-

ленвосстанавливающей активности и выделения CO_2 [Сварадж и др., 1984].

Недостаток молибдена в почве приводил к увеличению массы и количества клубеньков на корнях клевера, однако эти клубеньки отличались более мелкими размерами [Hallsworth, 1958].

В наших опытах мы поставили задачу провести сравнительное исследование механизма действия ряда неблагоприятных факторов, снижающих рост и продуктивность бобовых, на образование клубеньков, их азотфикссирующую активность и ультраструктуру.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили растения клевера красного сорта ВИК 7 (в опытах с недостатком и избытком влаги, и избытком нитратов) и сорт Тетраплоидный ВИК (в опытах по внесению молибдена). Изучение влияния подкормки клевера нитратным азотом проводилось в полевых условиях на базе ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса. Азот был внесен в количестве 120 кг/га, что представляло собой норму, рассчитанную по выносу элемента. Вегетационные опыты были поставлены в песчаной культуре. Растения, выращенные на симбиотическом азоте (при набивке в сосуды вносили 1/15 нормы азота по Кнопу), получили подкормку раствором KNO_3 из расчета полной нормы по Кнопу.

Влияние недостатка молибдена на симбиотическую систему клевера изучали в условиях вегетационных опытов в почвенной культуре, где содержание молибдена составляло 0,35 мг/кг почвы. Недостаток устраивали внесением молибдена из расчета 1 мг/кг почвы (вариант "норма" [Федорова, Потатуева, 1984].

Реакцию симбиотической системы клевера на различное увлажнение изучали в условиях вегетационных опытов в песчаной культуре. 5–6-недельные растения, выращенные на симбиотическом азоте при влажности 60% от полной влагоемкости песка, переводили в другой режим влагообеспечения — "недостаточное увлажнение" (30% от полной влагоемкости) или "избыточное увлажнение" (90% от полной влагоемкости), изменяя условия полива.

Изучая азотфиксацию в корневых клубеньках при неблагоприятных условиях выращивания растений, мы анализировали методом газовой хроматографии по Харди такие параметры работы симбиотической азотфикссирующей системы, как ацетиленвосстанавливающая активность, выделение H_2 и CO_2 [Сварадж и др., 1984; Жизневская и др., 1985].

Условия жизни высшего растения, например, освещенность, а также онтогенетическое состояние, оказывают существенное влияние на уровень выделяемого H_2 [Edie, Phillips, 1983]. Относительная эффективность азотфиксации (ОЭА) характеризуется уравнением $1-\text{H}_2/\text{C}_2\text{H}_4$, где C_2H_4 — количество восстановленного этилена, образовавшегося при восстановлении ацетилена [Schubert, Evans, 1976].

При анализе клубеньков на ранних этапах онтогенеза или клубеньков у растений, выращиваемых в экстремальных условиях, расчет азотфикссирующей активности на основании способности к восстановлению ацетилена C_2H_2 до этилена C_2H_4 дает значение потенциальной способности к азот-

фиксации, аналогично, например, потенциальному фотосинтезу. Эта величина может резко отличаться от реального уровня восстановления N_2 , поскольку значительная часть восстановленных эквивалентов (иногда до 70%) идет на выделение H_2 [Жизневская и др., 1985].

Оксилегемоглобин выделяли из клубеньков методом адсорбционной хроматографии на Al_2O_3 [Троицкая и др., 1979]. Для электронно-микроскопического исследования клубеньки фиксировали по стандартной методике, как описано ранее, в смеси 2,5%-го глутарового альдегида и 2%-го деполимеризованного параформальдегида и просматривали в электронном микроскопе JEM 100B [Федорова, Потатуева, 1984]. Срезы для исследования в световом микроскопе делали на пирамитоме LKB 11800.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Действие неблагоприятных условий на массу клубеньков и азотфикссирующую активность

Данные по влиянию неблагоприятных условий на образование клубеньков и азотфикссию в клубеньках клевера красного представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что как при избытке нитратов, так и при недостатке влаги снижается масса клубеньков на растении, что может быть объяснено нарушением процесса инфицирования корней. С другой стороны, при избыточном увлажнении и недостатке молибдена масса клубеньков в расчете на одно растение возрастает, но причины этого эффекта в обоих случаях различны. Так у растений клевера, выращиваемых при избыточном увлажнении, вслед за увеличением влажности почвы начинается образование придаточных корней, расположенных близко к поверхности почвы. При инфицировании ризобиями этих придаточных корней происходит образование новой генерации клубеньков, расположенных близко к поверхности почвы и находящихся вследствие этого в лучших условиях аэрации. За счет

этого масса клубеньков на растении значительно увеличивается, достигая к 3–4 нед выращивания при избыточном увлажнении 200% от контроля. На рис. 1 представлены корневые системы растений, выращиваемых при оптимальном увлажнении (60% от полной влагоемкости – контроль) и при избыточном увлажнении (90% от полной влагоемкости почвы – опыт).

У растений клевера, выращиваемых в условиях недостатка молибдена, увеличение массы клубеньков происходит, видимо, за счет образования большого числа клубеньков на боко-

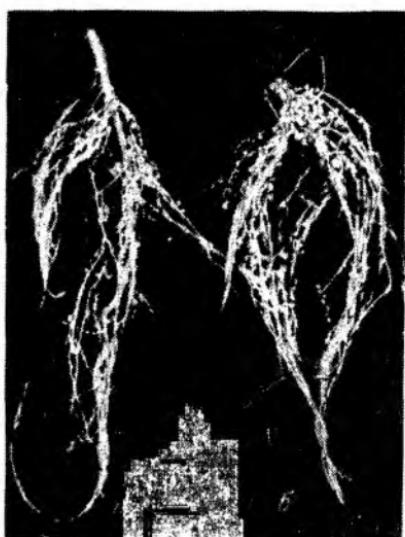


Рис. 1. Корневые системы растений клевера, выращиваемых в условиях оптимального (а) и избыточного (б) увлажнения

Таблица 1

Действие неблагоприятных условий на азотфиксацию и массу клубеньков клевера красного (фаза цветения)

Фактор внешней среды	Сухая масса клубеньков, мг/растение	Азотфиксация и дыхания клубеньков, мкмоль/г сухой массы клубеньков · ч			1- H_2/C_2H_4	Леггемоглобин, мг/г сухой массы клубеньков
		C_2H_4 при восстановлении C_2H_2	CO_2	H_2		
Норма	39,0 ± 1,0	81,3 ± 13,2	735,8 ± 152,6	52,9 ± 8,7	0,35	6,88 ± 0,34
Избыток нитратов	15,6 ± 1,8	27,9 ± 4,75	199,6 ± 31,2	8,87 ± 1,44	0,68	Следы
Норма	16,2 ± 1,76	300,5 ± 41,9	599,6 ± 44,2	7,1 ± 2,0	0,97	24,4 ± 3,19
Избыточное (90%) увлажнение	27,3 ± 3,84	106,3 ± 18,9	348,5 ± 60,3	48,7 ± 6,5	0,54	12,41 ± 0,65
Норма	18,2 ± 1,9	66,9 ± 8,0	Не опр.	15,4 ± 1,7	0,77	10,2 ± 2,2
Недостаток молибдена	44,4 ± 5,12	36,3 ± 1,6	То же	8,09 ± 1,2	0,78	6,35 ± 0,3
Норма	15,5 ± 2,8	305,9 ± 27,0	583,5 ± 116,9	26,3 ± 1,6	0,91	13,2 ± 1,8
Недостаточное увлажнение	8,9 ± 1,1	219,9 ± 26,2	411,0 ± 21,4	30,23 ± 4,6	0,87	19,5 ± 0,4

Таблица 2

Действие неблагоприятных факторов на рост и содержание азота у клевера красного (фаза цветения)

Фактор внешней среды	Воздушно-сухая масса надземной части, г/растение	Содержание азота в надземной части, % на абсолютно сухое вещество	Накопление азота в надземной части, мг/растение
Молибден			
норма	1,845 ± 0,03	1,74	32,1
недостаток	1,26 ± 0,07	1,57	19,5
Увлажнение			
норма (60%)	1,75 ± 0,05	3,15	55,1
избыток (90%)	0,975 ± 0,275	2,30	22,43
Увлажнение			
норма (60%)	2,10 ± 0,10	2,53	53,13
недостаток (30%)	1,10 ± 0,10	2,50	27,50

вых корнях, подобно тому, что наблюдалось в опытах Райли при недостатке кобальта [Riley, 1981]. Снижение содержания леггемоглобина (см. табл. 1) является общей реакцией растений клевера на недостаток молибдена, избыток влаги (недостаток кислорода) и избыток нитрата.

Из данных табл. 1 видно, что все неблагоприятные факторы вызывали снижение ацетиленвосстановливающей активности клубеньков клевера. Характерно, что при избытке нитрата и влаги ацетиленвосстановливающая активность клубеньков в расчете на 1 г сухой массы снижалась почти в 3 раза, при недостатке молибдена – в 2 раза. Под действием указанных факторов происходило также снижение выделения клубеньками CO_2 , характеризующее интенсивность дыхания клубеньков.

Увеличение уровня выделения водорода клубеньками при гипоксии, вызванной избыточным увлажнением, не связано со специфической реакцией клубеньков на этот неблагоприятный фактор и вызвано, очевидно, новообразованием молодых клубеньков третьей генерации, которые отличаются более высоким уровнем выделения водорода [Жизневская и др., 1985].

Следует указать, что в наших опытах ОЭА в клубеньках растений, выращенных при избыточном увлажнении, была низка. Это связано, видимо, с тем, что молодые клубеньки, образовавшиеся на придаточных корнях, отличаются более высоким уровнем выделения водорода.

При внесении избытка нитратов наблюдалась противоположная картина. Уровень выделения водорода клубеньками растений при избытке нитрата уменьшался в более сильной степени, чем снижалась азотфиксация, за счет чего ОЭА возрастала (табл. 1). Этот эффект, возможно, связан с быстрым старением клубеньков, вызванным нитратами, поскольку клубеньки клевера при старении выделяют значительно меньшее количество водорода, чем молодые.

Неблагоприятные факторы внешней среды (недостаток молибдена в почве, недостаток и избыток влаги) уменьшали сухую массу надземной части клевера и содержание в ней азота (табл. 2).

ИЗМЕНЕНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ КЛУБЕНЬКОВ КЛЕВЕРА ПРИ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ УСЛОВИЯХ

При исследовании ультраструктуры клубеньков клевера, выращиваемого при внесении большой дозы нитратного азота, оказалось, что бактероиды в средней части этих клубеньков имеют признаки ускоренного старения, выражавшегося в появлении большого количества инвагинаций цитоплазматической мембранны и клеточной стенки, за счет чего цитоплазма пронизана электронно-прозрачными каналами (рис. 2).

В клубеньках, имеющих зеленый цвет из-за окислительного распада гемового ядра нативного леггемоглобина и превращения его в зеленый пигмент холеглобин, наблюдалась и вторая стадия старения бактероидов, что проявлялось в их разрушении при сохранении целостности перибактероидной мембранны, ограничивающей перибактероидное пространство и область, ранее занятую бактероидом, как это показало на рис. 2. Дегенеративные изменения микросимбионта в этом случае являются необратимыми, вследствие чего азотфикссирующая активность клубеньков, имеющих подобную ультраструктуру, снижается до минимума. Как было отмечено в опытах на клевере белом [Carroll, Gresshoff, 1983], ингибирование нитрогеназной активности при внесении нитратов имеет две фазы. В первой фазе азотфикссирующая активность клубеньков падает до 30–40% от контроля, во второй она практически исчезает. Первая фаза обратима, вторая же необратима. Возможно, появление бактероидов с инвагинациями представляет собой отражение тех ультраструктурных изменений, которые свойственны первой фазе ингибирования. Появление "пустых" перибактероидных мембранны, вероятно, свойственно второй, необратимой фазе ингибирования. В связи с этим следует подчеркнуть, что в клубеньках, где отсутствует нативный оксилеггемоглобин, наблюдается вторая, необратимая стадия дегенерации бактероидов, которая предшествует разрушению клетки растения.

Сходные наблюдения были сделаны нами и в варианте, где клубеньки из-за избыточного увлажнения находились в условиях недостатка кислорода. Так, клубеньки, расположенные на средних и глубоких ярусах корневой системы, имели зеленый цвет, вследствие образования холеглобина, а бактероиды в них подвергались дегенерации. Цитоплазма их теряла электронную плотность, уменьшалось количество рибосом, бактероиды разбухали. В дальнейшем происходил лизис бактероидов внутри перибактероидной мембранны, сохранявшей целостность и ограничивающей участок, ранее занятый бактероидом, от цитоплазмы клетки-хозяина. Наблюдаемые изменения аналогичны описанным выше во второй фазе ингибирования нитрогеназной активности нитратным азотом (см. рис. 2).

При изучении ультраструктуры клубеньков растений, выращиваемых при недостатке молибдена, наблюдались те же признаки старения бактероидов, что и при избытке нитратов: образование инвагинаций цитоплазматической мембранны и клеточной стенки бактероида. Старение бактероидов в этом случае не было, видимо, специфическим эффектом, вызываемым собственно недостатком молибдена.

Образование инвагинаций наружной мембранны бактероида представляет собой общую, неспецифическую реакцию на избыток нитрата, недостаток

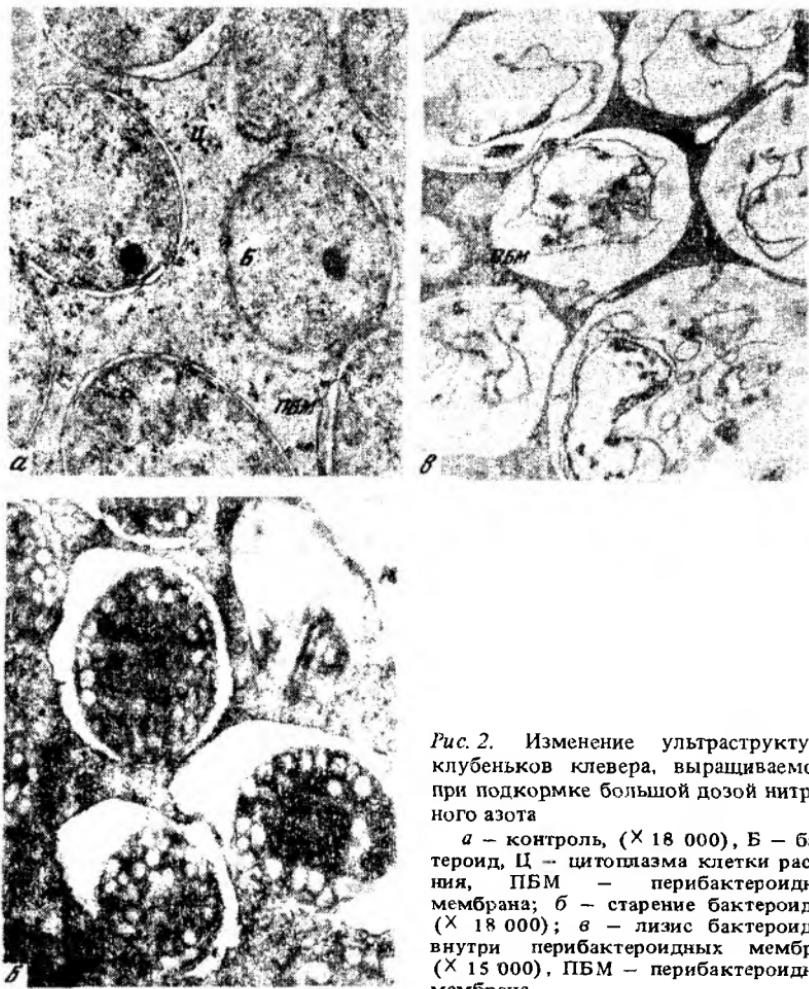


Рис. 2. Изменение ультраструктуры клубеньков клевера, выращиваемого при подкормке большой дозой нитратного азота

а – контроль, (× 18 000), Б – бактероид, Ц – цитоплазма клетки растения, ПБМ – перибактероидная мембрана; б – старение бактероидов (× 18 000); в – лизис бактероидов внутри перибактероидных мембран (× 15 000), ПБМ – перибактероидная мембрана

кислорода или молибдена и характеризует старение бактероида, связанное с превращением части оксилегемоглобина в зеленый пигмент холеглобин и с нарушением кислородного режима бактероидов и их дыхания, что, по-видимому, обусловливает снижение уровня восстановления молекулярного азота. Во всех случаях неблагоприятные факторы внешней среды, приводящие к ухудшению поступления O_2 к бактероидам за счет снижения уровня красного пигмента оксилегемоглобина, вызывали появление инвагинаций наружной мембранны бактероидов, возможно способствующих увеличению поверхности бактероида, соприкасающейся с перибактероидным пространством и извлекающей из перибактероидного пространства и леггемоглобина кислород.

Исследования симбиотической азотфиксации при влиянии неблагоприятных факторов внешней среды свидетельствуют о важной роли условий

существования растения-хозяина в процессе усвоения молекулярного азота бактероидами внутри корневых клубеньков и о необходимости учитывать эти факторы в практике выращивания бобовых растений на симбиотическом азоте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Желюк В.М., Овруцкая З.Г., Молдован Н.И., Заверюхин В.И. Активность нитратредуктазы и нитрогеназы в листьях и клубеньках сои при разной водообеспеченности // Физиология и биохимия культ. растений. 1985. Т. 17, № 1. С. 34–39.

Жизневская Г.Я., Федорова Е.Э., Дуброво П.Н. Выделение водорода клубеньками в онтогенезе клевера красного // Физиология растений. 1985. Т. 32, вып. 4. С. 724–731.

Посыпанов Г.С., Воронкова Т.В. Азотное питание клевера красного при естественном увлажнении и орошении // Биологические основы повышения урожайности сельскохозяйственных культур, М.: Россельхозиздат, 1981. С. 11–15.

Сварадж К., Шищенко С.В., Козлова Г.И., Андреева И.Н., Жизневская Г.Я. Действие водного дефицита на симбиотическую азотфиксацию у сои // Физиология растений. 1984. Т. 31, вып. 5. С. 833–840.

Троицкая Г.Н., Кудрявцева Н.Н., Ильясова В.Б. и др. Особенности азотфикссирующих систем клубеньков различных видов бобовых растений // Там же. 1979. Т. 26, вып. 2, С. 294–301.

Федорова Е.Э. Азотфикссирующая система красного клевера при избыточном увлажнении // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1987. № 2. С. 272–277.

Федорова Е.Э., Потатуева Ю.А. Ультраструктура и азотфикссирующая активность клубеньков красного клевера при внесении молибдена // Физиология растений. 1984. Т. 31, вып. 6. С. 1120–1126.

Човжик А.Д., Трепачев Е.П. Исследование действия возрастающих доз минеральных удобрений на продуктивность многолетних трав и последующих культур севооборота на дерново-подзолистой почве. Сообщ. 2. // Агрохимия, 1982. № 3. С. 84–94.

Bisseling T., van Staveren W., van Kammen A. The effect of waterlogging on the synthesis of nitrogenase components in bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1980, Vol. 93. P. 687–693.

Carroll B.J., Gresshoff P.M. Nitrate inhibition of nodulation and nitrogen fixation in white clover // Ztschr. Pflanzenphysiol. 1983. Bd. 110, N 1. S. 77–88.

Dazzo F.B., Brill W.J. Regulation by fixed nitrogen of host symbiont recognition in the *Rhizobium*–clover symbiosis // Plant Physiol. 1978. Vol. 62, N 1. P. 18–21.

Edie S.A., Phillips D.A. Effect of the host legume on acetylene reduction and hydrogen evolution by *Rhizobium* nitrogenase // Ibid. 1983. Vol. 72, N 1. P. 156–160.

Hallsworth E.G. Nutritional factors, affecting nodulation // Nutrition of the legumes: Proc. Univ. Nottingham, 1958. P. 183–201.

Lie T.A., Herio D., Lambers R., Houwers A. Symbiotic specialization in pea plants: some environmental effect on nodulation and nitrogen fixation // Symbiotic nitrogen fixation in plants / Ed. P.S. Nutman. Cambridge: Univ. press, 1976. P. 319–333.

Riley I.T. Cobalt effects on nodulation and nitrogen fixation of sweet lupins // Current perspectives in nitrogen fixation. Canberra: Austral. Acad. Sci., 1981. P. 473.

Schubert K.R., Evans H.J. Hydrogen evolution as major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1976. Vol. 73, N 4. P. 120–121.

Sprent J.I., Gallacher A. Anaerobiosis in soybean root nodules under water stress // Soil Biol. and Biochem. 1975, Vol. 8. P. 317–320.

СИМБИОТИЧЕСКАЯ ФИКСАЦИЯ АЗОТА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ХИМИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Л.Н. Пароменская

Всесоюзный научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии, Ленинград

Современное сельскохозяйственное производство немыслимо без широкого использования химических средств защиты растений, играющих важную роль в сохранении урожая и во многом определяющих экономическую эффективность его защиты от болезней, сорняков и вредителей. Производство пестицидов постоянно расширяется во всем мире, превысив в настоящее время 2 млн т. Предполагается, что химические средства защиты останутся важным звеном в борьбе с вредителями сельского хозяйства и в будущем [Мельников, 1984].

Негативной стороной применения пестицидов является ежегодное накопление их остатков в различных объектах окружающей среды ввиду персистентности иных из них. При этом в результате особенностей механизма их действия возможен отрицательный эффект на "нечелевые" организмы. Превращение системы химической защиты урожая к настоящему времени в новый экологический фактор делает необходимым контроль действия пестицидов на природные биологические системы. Особое место в этом плане занимает биологическая, и в первую очередь симбиотрофная, фиксация азота в связи с тем значением, которое она имеет в круговороте азота и получении высокого и качественного урожая бобовых культур.

Как известно, характер и эффективность взаимоотношений бобового растения с клубеньковыми бактериями в симбиотической системе определяется их физиологико-биохимическим состоянием. В то же время используемые в сельском хозяйстве пестициды — это физиологически активные вещества, оказывающие многообразное действие на различные стороны обмена в живом организме, направленность которого зависит от принадлежности препаратов к тому или иному классу химических соединений.

Среди всех химических средств защиты растений в современном земледелии наиболее широко применяются гербициды [Köhler, 1979]. Наличие среди них препаратов специфического действия на процессы, обеспечивающие энергетическую сторону фиксации атмосферного азота в симбиотической системе, такие, как фотосинтез и окислительное фосфорилирование, определяет потенциальную опасность подобных соединений для бобово-ризобиального симбиоза. Имеющиеся в литературе данные позволяют прийти к выводу о более высокой устойчивости к гербицидам микросимбионта по сравнению с высшим растением [Круглов, Пароменская, 1986]. Как правило, концентрации гербицидов, ингибирующие рост клубеньковых бактерий на искусственных питательных средах, во много раз превышают производственные дозы, варьируя в зависимости от химического строения препарата, а также вида и штамма бактерий. Однако действие некоторых гербицидов на биохимические процессы в культуре клубеньковых бактерий более значительно. Так, имеются сведения об ингиби-

Таблица 1
Влияние трефлана на массу растений сои

Вариант	Инокуляция		Без инокуляции	
	1	2	3	4
Контроль	55,0	100	53,2	100
Трафлан, мг/кг				
0,10	31,9	58,0	55,1	103,6
0,25	20,2	36,7	31,5	59,2
НСР _{0,95}	2,1		2,3	

Примечание. 1 — сырья масса 10 растений, г; 2 — масса, % от контроля.

вании дыхания у *Rhizobium* хлорфенолами [Huber, 1982], разобщение окислительного фосфорилирования под влиянием 2,4-Д [Pareelc, Sidhu, 1978]. Установлено изменение вирулентности клубеньковых бактерий, пассивированных на средах, содержащих гербициды 2М-4ХМ и 2М-4Х [Пароменская, 1980] и прометрин [Чеботарь, 1983].

Все это свидетельствует о необходимости более детального исследования роли микросимбионта, его резистентности к гербицидам в определении чувствительности симбиотической системы в целом.

При исследовании действия таких различных по своему химическому строению и механизму действия гербицидов, как атразин, 2М-4ХМ и трефлан, установлена общая закономерность — увеличение их токсичности для бобовых растений, находящихся в условиях симбиоза с клубеньковыми бактериями, по сравнению с растениями, выращиваемыми по фону минерального азота [Пароменская, 1980]. В табл. 1 представлены результаты вегетационного опыта с песчаной культурой сои, подтверждающие полученные ранее данные: инокуляция растений клубеньковыми бактериями увеличивает чувствительность сои к трефлану.

Эти результаты позволяют предположить особую чувствительность к гербицидам процесса симбиотической азотфиксации. Действительно, при исследовании в вегетационном опыте действия прометрина на эффективность бобово-ризобиального симбиоза у сои установлено снижение активности нитрогеназы при использовании гербицида в концентрации 1,5 мг/кг и практически полное ингибирование активности этого ферментного комплекса при большей дозе прометрина (табл. 2). Соответственно наблюдали в одном случае — уменьшение содержания фиксированного азота в растениях, в другом — отсутствие прибавки азота от инокуляции.

Негативное действие ряда гербицидов на нитрогеназную активность отмечается и в полевых опытах. Гербициды трефлан, сенкор, базагран и дуал, использованные в производственных дозах, существенно снижают активность нитрогеназы (табл. 3). Следует отметить, что в полевых опытах отрицательное действие гербицидов на азотфиксющую активность не всегда коррелирует со снижением урожая, поскольку такая обработка улучшает условия освещенности и минерального питания культурных растений в результате гибели сорняков. Однако доля "биологического"

Таблица 2

Эффективность бобово-ризобиального симбиоза у сои при применении прометрина

Вариант	Сырая масса 10 растений, г	Активность нитрогеназы, нМ C_2H_4 на 1 растение	Количество фиксированного азота, % от общего содержания
Контроль	180,3	32 650	74,2
Прометрин, мг/кг			
1,5	144,5	12 600	64,0
3,0	50,8	217	0

Таблица 3

Влияние гербицидов на нитрогеназную активность и урожай сои в полевых опытах

Вариант	Активность нитрогеназы		Урожай зерна, ц/га
	мМ C_2H_4 на 1 растение	% от контроля	
Контроль	39,4	100	18,7
Трефлан 1 кг/га	16,6	42	19,3
Сенкор 0,3 кг/га	21,8	55	15,7
Базагран 1,5 кг/га по вегетирующим растениям	17,1	43	19,8
Дуал 2,5 кг/га	2,7	7,0	13,6
НСР _{0,95}	1,8		2,1

азота в урожае при этом падает, а следовательно, снижается ценность бобовых культур как азотонакопителей.

Определение в инокулированном бобовом растении, выращиваемом в присутствии прометрина, доли минерального и "биологического" азота свидетельствует о том, что в первую очередь и в большей степени снижается содержание фиксированного азота (табл. 4).

Что же касается поступления минерального азота в растения, то в ряде случаев отмечается стимулирующее действие гербицидов, в частности сим-триазинов на поглощение растениями NO_3^- [Kadam et al., 1977; Пароменская, Кожемяков, 1986], кроме того, отмечается факт индуцирования нитратредуктазной активности в растениях при действии этой группы гербицидов [Пароменская, 1984].

Степень негативного действия гербицидов на различные параметры симбиотической фиксации азота определяется различными факторами — химическим строением препарата, его дозой, временем и способом внесения, видом бобового растения [Круглов, Пароменская, 1986]. Определяющий фактор влияния гербицидов галоидфеноксикислот — состояние

Таблица 4
Содержание азота в растениях сои

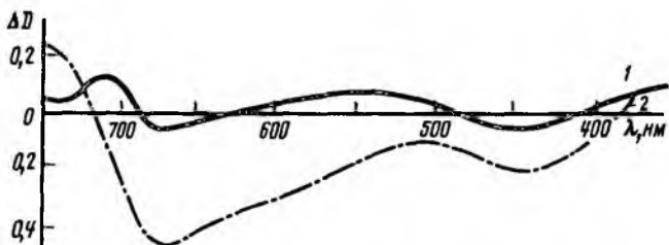
Вариант	Общий азот		Минеральный азот		Азот атмосферы	
	мг/10 растений	% от контроля	мг на 10 растений	% от контроля	мг на 10 растений	% от контроля
Контроль	1493	100	381,1	100	1107	100
Прометрин, мг/кг						
1,5	1092	73	390,6	101,3	701	63,3
3,0	300,8	20,1	337,9	87,6	0	0

Таблица 5
Влияние 2М-4ХМ на эффективность симбиоза у гороха

Вариант	Сырая масса наземной части	Сукцинатдегид- рогеназная активность клубеньков, мг ТФФ на 1 г	Содержание леггемогло- бина, ед. опт. плотности	Количество фиксированно- го азота, % от общего
Контроль	30,9	0,08	0,154	42
Обработка 2М-4ХМ				
в фазе 1–2 листьев	29,9	0,11	0,150	47
в фазе 3–4 листьев	30,3	0,12	0,155	55
в фазе 7–8 листьев	19,2	0,03	0,05	18,5

симбиотического аппарата или возраст растений в момент обработки. В вегетационном опыте с культурой гороха применяли гербицид 2М-4ХМ в различные сроки: в фазу 1–2 листьев, когда растения не имели клубеньков, 3–4 листа, когда клубеньки начинали образовываться, и 7–8 листьев – при наличии на корнях активно функционирующих клубеньков. Последняя обработка способствовала снижению массы растений и фиксации атмосферного азота, уменьшению дегидрогеназной активности клубеньков и снижению в них количества леггемоглобина (табл. 5). При обработке растений на более ранних фазах развития симбиоза не наблюдалось подобного токсического действия. Полученные результаты еще раз подтверждают вывод об особой чувствительности процесса симбиотической фиксации азота к гербицидам.

Основная причина высокой чувствительности бобово-ризобиального симбиоза к гербицидам – тесная зависимость состояния этой системы от многих этапов обмена веществ в высшем растении, подверженных действию гербицидов: фотосинтеза со всеми составляющими его механизмами, вторичных метаболических реакций азотного обмена, содержания и активности эндогенных регуляторов роста и т.п. При этом для каждой группы гербицидов может быть представлен индивидуальный механизм действия на симбиотические взаимоотношения в системе бобовое растение – клубенковые бактерии, определяемый химическим строением препарата.



Дифференциальные спектры поглощения листьев сои
1, 2 – прометрин 1,5 и 3 мг/кг соответственно

Так, для сим-триазиновых гербицидов, а также производных мочевины, механизм действия которых заключается в блокировании транспорта электронов при фотосинтезе, характерна высокая токсичность и для процесса симбиотической фиксации азота [Пароменская, 1984].

В вегетационном опыте установлено, что при внесении под сою одного из сим-триазиновых гербицидов – прометрина – в концентрациях, ингибирующих азотфиксацию, происходит значительное снижение количества зеленых и желтых пигментов, а также уменьшение отношения хлорофиллов *a* и *b*, что свидетельствует о нарушении активности фотохимического аппарата растений (табл. 6). Дифференциальные спектры поглощения пигментов *in vivo* выявляют значительные изменения их спектральных характеристик под влиянием прометрина – уменьшение интенсивности поглощения в области фотохимически активной формы хлорофилла с максимумом при 680 нм (см. рисунок).

Особого внимания при этом заслуживает факт изменения соотношения длинноволновых и коротковолновых полос в области поглощения хлорофилла. Относительное увеличение интенсивности поглощения длинноволновых форм хлорофилла свидетельствует об усилении агрегации молекул пигмента в хлорофилобелковом комплексе листа под влиянием прометрина. Причиной такой агрегации может служить образование комплексов донорно-акцепторного типа между молекулой гербицида и хлорофиллом, возможность которого для сим-триазинов была установлена нами ранее в модельных опытах [Пароменская, 1970]. В свою очередь, подобное комплексообразование может являться одним из факторов, ответственных за негативное действие симтриазинов на пигменты и процесс фотосинтеза в целом, а следовательно, и за ингибирование процесса симбиотической фиксации азота.

Однако опосредованное действие гербицидов на процесс симбиотической азотфиксации через высшее растение – не единственный механизм. В модельных опытах с интактными клубеньками, инкубированными в растворах различных гербицидов, установлен значительный диапазон действия этих физиологически активных веществ на активность нитрогеназы – от стимуляции до полного торможения (табл. 7). Характер действия при этом зависел от вида бобового растения, фазы его развития, которая определяла функциональное состояние клубеньков, а также штамма *Rhizobium*, использованного для инокуляции.

Таким образом, в случае поступления гербицидов в клубеньки, они

Таблица 6

Содержание фотосинтетических пигментов в листьях сои при обработке прометрином

Вариант	Пигменты, мг на 1 г сырой массы			Хлорофилл <i>a</i> /хлорофилл <i>b</i>
	хлорофилл <i>a</i>	хлорофилл <i>b</i>	каротиноиды	
Контроль	4,6	1,51	1,05	3,05
Прометрин, мг/кг				
1,5	2,2	0,84	0,65	2,62
3,0	1,7	0,91	0,49	2,50

Таблица 7

Влияние гербицидов на нитрогеназную активность интактных клубеньков (*in vitro*)

Клубеньки гороха			Клубеньки сои		
Вариант	Активность нитрогеназы, % от контроля		Вариант	Активность нитрогеназы, % от контроля	
2М-4ХМ	0,2 г/л	46,2	Трефлан	1 мг/л	66,0
	2 г/л	6,2		10 мг/л	50,0
2М-4ХМ	0,2 г/л	146,0	Прометрин	1 мг/л	7,6
	2 г/л	56,0		10 мг/л	3,4

Таблица 8

Локализация и трансформация ^{14}C 2,4-Д в растениях гороха через сутки после обработки

Часть растения	Общая активность, имп/мин·г	2,4-Д	Фенольные метаболиты	Ациклические метаболиты
			% от общей активности	
Корни	400	7,7	10,0	82,3
Клубеньки	3550	7,2	2,0	90,8

могут вызывать те или иные изменения активности процесса фиксации азота. В связи с этим несомненен интерес определения возможности локализации гербицидов в клубеньках. При использовании гербицида 2,2-Д, меченного ^{14}C по углероду кольца, для обработки вегетирующих растений гороха установлено, что гербицид, передвигаясь в корневую часть растений, концентрируется в клубеньках, подвергаясь там активной трансформации до метаболитов фенольной и ациклической природы (табл. 8). Кроме того, интересно отметить, что общая активность ^{14}C в клубеньках по сравнению с тканями корня значительно увеличивается при обработке растений гороха в фазе 7–8 листьев (табл. 9), что коррелирует с ингибирующим действием этой обработки на эффективность симбиоза.

Таблица 9

Содержание ^{14}C 2,4-Д в корневой части гороха через неделю после обработки

Обработка растений 2,4-Д	Корни	Клубеньки
	имп/мин г	
В фазе 3–4 листьев	480	665
В фазе 7–8 листьев	314	3180

Таблица 10

Влияние штамма на чувствительность симбиотической азотфиксации у гороха к прометрину

Штамм	Прометрин, 0,005 мг/кг			
	Сухая масса, 10 растений, г	Активность нитрогеназы, мм на 1 растение	Фиксированный азот, мг	Сухая масса 10 растений, г
245а	4,58	35,0	42,8	5,24
250а	5,04	41,2	42,2	4,95
240б	4,92	35,2	39,0	4,93

Штамм	Прометрин, 0,005 мг/кг		Прометрин, 0,1 мг/кг		
	Активность нитрогеназы, мм на 1 растение	Фиксированный азот, мг	Сухая масса 10 растений, г	Активность нитрогеназы, мм на 1 растение	Фиксированный азот, мг
245а	111,8	67,4	4,69	51,6	52,8
250а	28,9	56,2	4,07	19,4	12,9
240б	69,8	20,4	4,34	13,6	10,4

Таким образом, концентрирование и трансформация гербицидов в клубеньках определяют влияние этих веществ на активность симбиотической фиксации азота и взаимоотношения *Rhizobium* с бобовым растением.

Практический интерес представляет вопрос о роли микросимбионта в отношении симбиотической системы к гербицидам. В стерильном вегетационном опыте с песчаной культурой гороха использовали различные штампы *R. leguminosarum* для предпосевной инокуляции. Полученные результаты свидетельствуют о различной устойчивости таких симбиотических систем к прометрину (табл. 10). Обе испытанные дозы гербицида стимулировали нитрогеназную активность в клубеньках при инокуляции штамма 245а. При использовании прометрина в концентрации 0,1 мг/кг в вариантах со штаммами 250а и 240б наблюдали снижение уровня нитрогеназной активности и количества фиксированного азота.

Итак, действие гербицидов на бобово-ризобиальный симбиоз опреде-

ляется чувствительностью к ним микро- и макросимбионта, ферментного комплекса нитрогеназы, ответственного за фиксацию азота, а также локализацией и трансформацией в инокулированном растении. Все сказанное свидетельствует о том, что для рационального и безопасного использования химических средств защиты растений на посевах бобовых культур необходимо проведение предварительной оценки их действия по отношению к бобово-ризобиальному симбиозу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Круглов Ю.В., Пароменская Л.Н. Гербициды и бобово-ризобиальный симбиоз // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1986. № 2. С. 238–249.

Мельников Н.Н. Основные современные требования к пестицидам и направления развития их производства и применения // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева. 1984. № 1. С. 3–9.

Пароменская Л.Н. Влияние триазиновых гербицидов на физиолого-биохимические процессы в зеленых водорослях: Автoref. дис. ... канд. биол. наук. 1970. 24 с.

Пароменская Л.Н. Влияние пестицидов на симбиотические взаимоотношения Rhizobium с бобовыми растениями // Тр. ВНИИСельхозмикробиологии. 1980. Т. 50. С. 97–111.

Пароменская Л.Н. Механизм действия триазинов на симбиотическую азотфиксацию // Тез. докл. XIV Междунар. симпоз. "Механизмы действия гербицидов и синтетических регуляторов роста растений". Уфа, 1984. С. 40–45.

Пароменская Л.Н., Кожемяков А.П. Влияние гербицида прометрина на азотное питание сои // Бюл. ВНИИСельхозмикробиологии. 1986. № 43. С. 13–15.

Чеботарь Н.И. Взаимоотношения клубеньковых бактерий с растением сои при обработке гербицидами: Автoref. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1983. 16 с.

Huber S.Y. Modelluntersuchungen zur Wirkung aromatischer Herbizid-Metaboliten auf Bodenmikroorganismen und auf die symbiotische Stickstoff-Fixierung: Diss. Dokt. Agrarwiss. München, 1982. 111 S.

Kadam S.S., Kachave K.G., Chavan J.K., Salunkne D.K. Effect of nitrogen Rhizobium inoculation and simazin on yield and quality of Bengal gram // Plant and Soil. 1977. Vol. 17, N 1. P. 279–281.

Köhler E. Modern Landwirtschaft und Herbizide // Naturforschung. 1979. Bd. 34, N 11. S. 895–898.

Pareek R.P., Sidhu B.S. Uncoupling of phosphorylation in Rhizobium spp. by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and Taficide-80 // Ind. J. Microbiol. 1978. Vol. 18, N 2. P. 97–101.

АКТИНОРИЗА И ЕЕ РОЛЬ В БИОЛОГИЧЕСКОЙ АЗОТФИКСАЦИИ

С.В. Добрица

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
АН СССР, Пущино

Среди азотфиксаций симбиотических ассоциаций растений с микроорганизмами наиболее важен в сельском хозяйстве и наиболее изучен симбиоз бобовых растений с клубеньковыми бактериями. Вместе с тем другой тип эндосимбиоза — азотфиксацирующие клубеньки, образуемые при инфекции корней небобовых растений актиномицетами, или актинориза, — по своей роли в природе, разнообразию видов растений, количеству фиксируемого азота и энергетической экономичности процесса азотфиксации не уступает бобово-ризобиальному симбиозу, а нередко и превосходит его. Открытый еще в прошлом веке актиноризный симбиоз практически не изучался до 1950-х гг., когда было признано значение растений с актиноризой для лесоводства. Особенно возрос интерес к актиноризе в последнее десятилетие на фоне общего усиления внимания к биологической азотфиксации.

Фундаментальные знания об актиноризной ассоциации пока в значительной степени фрагментарны по сравнению с тем, что известно о симбиозе между *Rhizobium* и бобовыми растениями. В особенности это относится к физиолого-биохимическим взаимодействиям в процессе симбиоза, генетике и молекулярной биологии этого процесса. Недостаток сведений о микробном партнере актиноризных клубеньков существенно восполнился после того, как научились выделять и культивировать *in vitro* актиномицеты рода *Frankia*. Настоящий обзор в основном касается азотфиксацирующего симбиоза, поэтому рассматриваются только некоторые особенности чистых культур *Frankia*, имеющие отношение к симбиозу или азотфиксации.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АКТИНОРИЗЫ

Все известные небобовые актиноризные растения относятся к двудольным покрытосеменным древесным и кустарниковым видам, за исключением *Datisca* spp. — многолетних травянистых растений [Bond, 1983]. Актинориза обнаружена у далеких в таксономическом (и, вероятно, филогенетическом) отношении растений (табл. 1) из 7 (8 согласно другой классификации) порядков, 8 семейств, 23 родов и 215 видов. Таким образом, этот тип симбиоза по разнообразию растений-хозяев значительно превосходит бобово-ризобиальный симбиоз. К актиноризным относятся такие распространенные растения, как ольха (*Alnus*), лох (*Elaeagnus*), облепиха (*Hippophaë*), восковница (*Mugica*). Список видов с актиноризой постоянно пополняется, наибольший вклад внесли исследования в рамках Международной биологической программы. Однако достаточно

систематического изучения растений, особенно тропических, не проводилось.

В ряде семейств все роды включают виды с актиноризой, в других образование клубеньков ограничено только определенными родами. Количество видов с клубеньками внутри родов также сильно варьирует, однако в целом способность к актиноризному симбиозу можно рассматривать как свойство всего рода, и по мере расширения исследований наблюдается тенденция к уменьшению числа бесклубеньковых видов во всех родах.

Актиноризные растения распространены по всему земному шару от субполярных областей до тропиков, но основная их масса занимает районы с умеренным климатом в отличие от преимущественного распространения бобовых растений в тропическом и теплом климате. В высоких широтах обоих полушарий (север СССР, Скандинавия, Канада, Новая Зеландия), где бобовые отсутствуют или незначительны в природных популяциях, главным образом растения с актиноризой поставляют связанный азот в почву за счет атмосферного N_2 . Эти растения относительно независимы от почвенного плодородия и способны колонизировать разнообразные субстраты вплоть до бесплодных земель, лишенных азота. Широкий экологический диапазон распространения актиноризных растений обусловлен еще и тем, что среди них встречаются виды, устойчивые к экстремальным температурам, рН, влажности, толерантные к соляным брызгам.

Крайняя неприхотливость растений с актиноризой проявляется при заселении ими песчаных дюн, гравия, аллювия, глины, лёсса, кислых, засоленных и заболоченных почв. Эти растения среди первых поселяются на ледниковых субстратах, вулканических отложениях, склонах гор, осыпях, вырубках, на почвах, нарушенных пожаром, вулканической деятельностью, водной и ветровой эрозией, обогащая эти субстраты азотом и органическим веществом. Актинориза способна фиксировать до 362 кг N/га в год [Калакуцкий, Парийская, 1984], и лишь уменьшение нитрогеназной активности с возрастом ответственно за то, что в среднем многолетние актиноризные клубеньки фиксируют меньше азота, чем молодые клубеньки однолетних бобовых растений. Действуя как пионеры при заселении бесплодных земель, азотфикссирующие небобовые растения повышают уровень плодородия до величины, благоприятной для развития других растений и представляют собой, таким образом, важнейший компонент растительных сукцессий в природных экосистемах.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ОБРАЗОВАНИЕ КЛУБЕНЬКОВ

Степень развития клубеньковой системы в природе не всегда оптимальна для роста актиноризных растений. Основные почвенные факторы, в той или иной мере влияющие на образование клубеньков, – рН, температура, влажность, аэрация, содержание азота, минеральное питание растений, в особенности наличие молибдена и кобальта [Akkermans, van Dijk, 1981]. Образование клубеньков зависит также от возраста растений. Как правило, перечисленные факторы действуют параллельно на образование клубеньков и на их функцию, т.е. на процесс азотфиксации.

Однако первостепенную роль в образовании клубеньков на корнях актиноризных растений играет наличие в почве и инфекционная способ-

Таблица 1
Растения, способные к симбиозу с *Frankia*

Порядок	Семейство	Число родов в семействе	Род, способный к симбиозу
Casuarinales (Verticillatae)*	Casuarinaceae	4	<i>Casuarina</i> <i>Allocasuarina</i> <i>Gymnostoma</i>
Fagales	Betulaceae	2	<i>Alnus</i>
Myrales (Junglandales)	Myricaceae	2	<i>Myrica</i>
Rhamnales	Rhamnaceae	58	<i>Comptonia</i> <i>Ceanothus</i> <i>Colletia</i> <i>Discaria</i> <i>Kentrothamnus</i> <i>Talguenea</i> <i>Trevoa</i>
(Thymelaeales)	Elaeagnaceae	3	<i>Elaeagnus</i> <i>Hippophaë</i> <i>Shepherdia</i>
Rosales	Rosaceae	124	<i>Cercocarpus</i> <i>Chamaebatia</i> <i>Cowania</i> <i>Dryas</i> <i>Purshia</i> <i>Rubus</i>
Coriariales (Sapindales)	Coriariaceae	1	<i>Coriaria</i>
Cucurbitales (Violales)	Datiscaceae	3	<i>Datiscia</i>

* В скобках указан порядок согласно классификации Энглера (см. [Bond, 1983]).

** Число видов с клубеньками, превышающее общее число видов рода (*Alnus*, *Coriaria*), отражает разногласия среди taxonomistов относительно того, что считать видом.

*** Распространение растений с клубеньками отмечено только в указанных районах, общее распространение значительно шире.

ность специфичных штаммов эндофитов. Формирование и поддержание в почве адекватной популяции эндофита в основном зависит от его симбиотического роста и последующего освобождения из разрушающихся и отмирающих клубеньков (продолжительность жизни которых составляет 4–5 лет), т.е. определяется ареалом распространения хозяйственного растения. Вместе с тем наблюдалось и независимое от растений распространение эндофитов в ряде почв, где длительное время не произрастали хозяйственные виды, что дает основания предполагать размножение эндофита вне клубенька, длительное выживание в почве или миграцию в природных условиях [Akkermans, van Dijk, 1981]. Вероятным фактором является

Число видов в роде	Число видов с клубеньками	Географическое распространение
65	38	Австралия, тропическая Азия, острова Тихого океана, восточное побережье Африки; интродуцированы в других районах тропиков и субтропиков
35	38**	Европа, Сибирь, Китай, Япония, Северная Америка, Анды
35	25	Тропические, субтропические, умеренные районы почти до Полярного круга
1	1	Северная Америка
55	31	Северная Америка, особенно запад США
17	3	Умеренные и субтропические районы Южной Америки
10	5	Анды, Бразилия, Австралия, Новая Зеландия
2	1	Боливия, Аргентина
1	1	Чили
6	2	Тихоокеанское побережье Северной Америки, Анды
45	33	Европа, Азия, Северная Америка
3	1	Европа, Азия (от Гималаев до Полярного круга)
3	2	Северная Америка
20	6	Запад США, Мексика
2	1	Сьерра-Невада (Калифорния)
5	2	Запад Северной Америки
4	3	Аляска, Канада (субполярье) ***
2	2	Запад Северной Америки
250	2	о-в Ява (Индонезия), Новая Гвинея ***
15	16**	Средиземноморье, Китай, Япония, Чили, Мексика
2	2	Северная Америка (особенно Калифорния), от Средиземноморья до Гималаев и Центральной Азии

ся также отсутствие строгих барьеров хозяйственной специфичности у штаммов *Frankia* (см. ниже).

Степень образования клубеньков на корнях актиноризных растений может зависеть от биотического сообщества в почве. Так, почвенные псевдомонады стимулируют образование клубеньков, возможно, за счет продукции субстратов, литических ферментов, гормонов и других веществ, влияющих на *Frankia* или растение-хозяин. Отмечалась стимуляция образования клубеньков и повышенная продуктивность тройных ассоциаций (актиноризное растение – *Frankia* – микоризообразователи).

ХОЗЯЙСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ FRANKIA

Большинство ранних исследований по хозяйствской специфичности эндофитов в актиноризных симбиозах не дали однозначных результатов [Becking, 1982], так как в качестве инокулята использовали разрушенные клубеньки, которые могут содержать более одного штамма эндофита. Число проверенных комбинаций между чистыми культурами *Frankia* и хозяйствами растениями пока ограничено, однако некоторые закономерности установлены [Normand, Lalonde, 1986]. В результате четко определились две группы хозяйствской специфичности: первая включает роды *Alnus*, *Mugica* и *Comptonia*, вторая – *Elaeagnus*, *Hippophaë*, *Shepherdia* и *Colletia*. Как правило, внутри этих групп большинство комбинаций хозяйствских растений и изолятов *Frankia* приводят к образованию эффективных (редко неэффективных) клубеньков, тогда как при перекрестных реакциях между представителями разных групп клубеньки не образуются. Неопределенность ситуации со штаммами, выделенными из клубеньков *Casuarina* spp., заключается в том, что около половины из них образуют эффективные клубеньки на корнях *Hippophaë* и *Elaeagnus* spp., но не инфекционны для собственных хозяев, тогда как остальные ведут себя нормально. Единичные комбинации, в которых испытывались представители родов *Ceanothus*, *Purshia* и *Datisca*, не обнаружили совместимости со штаммами *Frankia*, выделенными из клубеньков растений других родов.

В целом полученные результаты указывают на существование у актиномицетов рода *Frankia* барьера хозяйствской специфичности, не позволяющих им инфицировать растения вне определенной группы. Тем не менее некоторые штаммы способны преодолевать эти барьеры, и, кроме того, установленные группы включают растения, относящиеся к разным родам и семействам внутри одного или разных порядков (см. табл. 1), тогда как инфекционная способность *Rhizobium* spp. обычно ограничена одним родом бобовых растений. Таким образом, значительно более широкий спектр хозяйствской специфичности, чем у *Rhizobium*, характерен не только для рода *Frankia* в целом, но и для каждого отдельного изолята.

В азотфиксирующих симбиозах растений с микроорганизмами фиксация азота и продукция биомассы зависят от адекватности партнеров. Гетерогенность штаммов *Frankia*, выделенных из клубеньков растений одного вида, может проявляться в градациях степени эффективности (нитрогеназной активности) клубеньков, в том числе в образовании дефицитных по нитрогеназе (неэффективных) клубеньков, что можно рассматривать как один из типов реакции несовместимости. Степень совместимости между хозяйствами растениями и штаммами *Frankia* может выражаться также в скорости образования клубеньков [Nesme et al., 1985]. Эффективность штамма повышается при функционировании в его клетках гидрогеназы (см. ниже), и при прочих равных условиях штаммы *Sp*(-)-типа обычно значительно более эффективны, чем штаммы *Sp*(+)-типа, тогда как инфекционность, определяемая числом клубеньков, образованных на единицу веса инокулята, в 1000 раз выше у последних [Houwers, Akkermans, 1981].

РАЗВИТИЕ КЛУБЕНЬКОВ

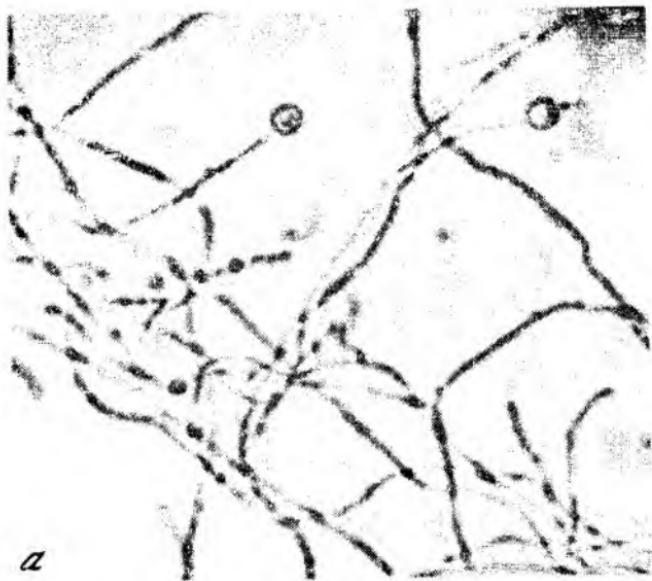
Формирование симбиотической ассоциации предполагает целую серию преобразований, ведущую к сложным сбалансированным взаимодействиям между организмами-партнерами, прежде всего – узнавание между макро- и микросимбионтом. Биохимия этого процесса пока не изучена для актиноризы, однако способность клеток *Frankia* связывать лектины [Chaboud, Lalonde, 1983] предполагает возможное участие этих соединений в процессе узнавания.

Первое регистрируемое проявление взаимодействия актиноризного растения и эндофита – специфическая деформация корневых волосков растения – коррелирует с присутствием *Frankia* вблизи корней, но не требует непосредственного контакта. Предполагают [Becking, 1977], что эндофит воздействует на корневые волоски, продуцируя ростовые вещества типа ауксинов.

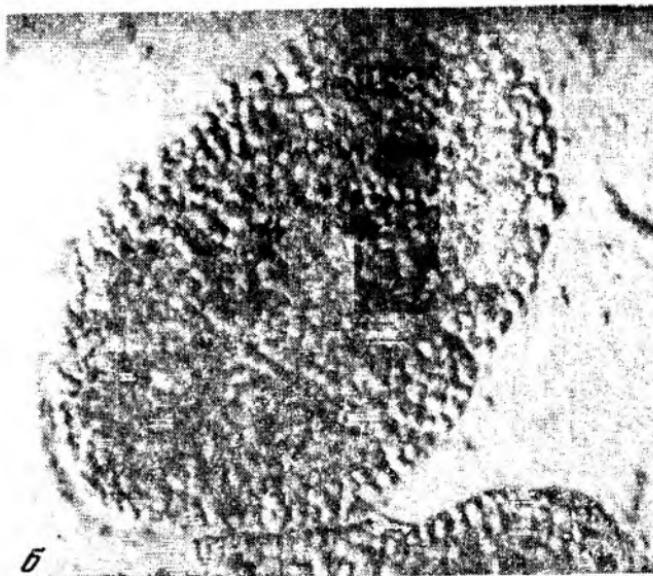
Процесс развития актиноризных клубеньков делят на несколько основных стадий [Akkermans, van Dijk, 1981]: первичная инфекция, образование первичного клубенька и формирование настоящего клубенька. Инфекция включает проникновение в клетку корневого волоска и развитие там гиф актиномицета. Наиболее чувствительный к инфекции участок, по-видимому, располагается, вблизи растущего конца корневого волоска, и инвазия происходит через точку изгиба деформированного волоска. Клеточная стенка и плазмалемма хозяина инвагинируют, окружая гифы эндофита. На всех стадиях симбиотического существования клетки эндофита отделены от цитоплазмы хозяйственных клеток также слоем капсулального вещества [Molroud, Gianinazzi-Pearson, 1984], вероятно, хозяйствского происхождения, не характерного для клубеньков бобовых растений.

Цитологические исследования выявили сходство в развитии клубеньков у актиноризных растений разных видов. Растущие гифы эндофита, распространяясь из корневого волоска, индуцируют деление кортикальных клеток основного корня, в результате чего образуется слабое утолщение – так называемый первичный клубенек. (Недавно у *Elaeagnus* был обнаружен другой путь инфекции – непосредственно через эпидермис корня в клетки кортекса [Miller, Baker, 1985], при этом стадия первичного клубенька элиминируется.) Затем вблизи первичного клубенька закладываются 1–2 боковых корня, трансформирующиеся после инфекции клеток кортекса в дольки настоящего клубенька, ограниченный апикальный рост и обильное ветвление которых ведет к образованию сферического многодольного органа. Предполагают, что развитие клубеньков у актиноризных растений, как и у бобовых, регулируется фитогормонами, так в актиноризных клубеньках обнаружены ауксины, цитокинины и гибербереллины [Wheeler et al., 1979], происхождение и функции которых пока не установлены.

Актиноризные клубеньки морфологически и анатомически отличаются от клубеньков бобовых растений [Becking, 1970]. Большинство родов образует клубеньки *Alnus*-типа, состоящие из коротких утолщенных дольей. Мугиса-тип клубеньков с тонкими длинными долями, верхушка каждой из которых образует направленный вверх корень, характерен



а



б

Образование везикул (а) и спорангииев со спорами (б) в культуре *Frankia* sp. *in vitro*

Негативы любезно предоставлены А.В. Гавриловым
($\times 1040$)

также для растений родов *Comptonia*, *Rubus*, *Casuarina*. Доли клубеньков представляют модифицированные боковые корни и состоят из центрального сосудистого цилиндра, окруженного эндодермисом, слоем коровой паренхимы и эпидермисом [Becking, 1977]. Эндофит локализуется в клетках кортекса и никогда не инфицирует сосудистую ткань и верхушечную меристему, из которой образуются молодые кортикальные клетки, обеспечивая непрерывный рост эндофита. Механизм проникновения гиф эндофита через клеточную стенку хозяина пока не ясен, вероятно, имеет место энзиматическое воздействие, возможно, посредством пектиназы и/или целлюлазы.

Морфогенез эндофита в клубеньках актиноризных растений [Moiroud, Gianinazzi-Pearson, 1984] аналогичен внесимбиотическому развитию *Frankia* (см. рисунок). На верхушках гиф — первичной формы эндофита — развиваются везикулярные структуры, некоторое их количество — уже в клетках первичного клубенька, но основная масса — в истинном клубеньке. Сложная внутренняя ультраструктура везикул включает множество цитоплазматических мембран и мезосом. Форма везикул (сферическая, булавовидная или грушевидная) и наличие внутри них септ всецело зависят от вида растения [Moiroud, Gianinazzi-Pearson, 1984]. В клубеньках *Casuarina* spp. везикулы не образуются или неотличимы от гиф, хотя культуры из клубеньков этих растений образуют *in vitro* нормальные сферические везикулы.

В клубеньках некоторых родов растений при инфекции определенными штаммами эндофитов развиваются спорангии со спорами [Akkermans, van Dijk, 1981]. Соответственно клубеньки и штаммы *Frankia* делят на Sp(+) и Sp(—). Везикулы и споры, как правило, не образуются в одной клетке, и спорообразование наблюдается в старых участках клубенька, где везикулы дегенерировали и разрушены литической активностью хозяина. Поэтому образование везикул и спор рассматривают как альтернативные пути развития микросимбионта, предназначенные соответственно для азотфиксации и для выживания, репродукции и распространения эндофита.

ФИКСАЦИЯ АЗОТА

Центральная проблема симбиоза актиномицетов с небобовыми растениями — фиксация молекулярного азота, бесспорно доказанная по включению $^{15}\text{N}_2$ клубеньками разных видов актиноризных растений. Актиноноризная ассоциация относится к высокоспециализированным азотфиксирующими симбиозам и занимает первое место по количеству азота, фиксированного на единицу веса ткани клубенька. Вероятно, процесс фиксации азота протекает у *Frankia* в специализированных клетках — везикулах, функционально аналогичных гетероцистам цианобактерий. Недавно методами иммунохимии было показано [Meesters, 1987], что *in vitro* нитрогеназа локализуется исключительно в везикулах. Это согласуется с тем, что клубеньки, образованные неэффективными штаммами *Frankia*, не содержат везикул [Baker et al., 1980], что проявление нитрогеназной активности, ее уровень и локализация в апикальных участках клубенька коррелируют с образованием и количеством везикул [Becking, 1977]. Повреж-

дение везикул при подкормке растений аммонием параллельно с ингибированием нитрогеназы [Huss-Danell et al., 1982], высокая ацетиленредуцирующая активность бесклеточных экстрактов везикул и фракций везикул из клубеньков [Benson et al., 1979], связь между образованием везикул и фиксацией N_2 в культурах *Frankia* [Toggey, Callaham, 1982] – все это говорит в пользу участия везикул в азотфиксации.

Биохимия процесса азотфиксации и сопряженных процессов в актиноризных растениях пока изучена слабо [Dixon, Wheeler, 1983]. Вероятно, *Frankia* редуцируют N_2 в аммиак аналогично всем азотфиксирующими микроорганизмам с помощью ферментного комплекса нитрогеназы, свойства которой (необратимая инактивация кислородом, требование ATP, ионов Mg^{2+}), изученные на бесклеточных препаратах [Benson et al., 1979], близки к свойствам соответствующих ферментов других азотфиксаторов.

Все азотфиксющие организмы в процессе эволюции приобрели тот или иной механизм защиты нитрогеназы от инактивации кислородом. В отличие от клубеньков бобовых растений парциальное давление кислорода в актиноризных клубеньках близко к атмосферному [Тјеркема, 1983]. По-видимому, защита обеспечивается особой структурой везикул *Frankia*, внутри которых поддерживаются восстановительные условия [Akkermans, van Dijk, 1981]. Способность свободноживущих *Frankia* в отличие от *Rhizobium* редуцировать ацетилен и N_2 почти на таком же уровне, как в клубеньках, при близком к атмосферному pO_2 [Toggey, Callaham, 1982] предполагает, что многослойная клеточная оболочка везикул сама по себе обеспечивает достаточный уровень защиты от кислорода. Следовательно, в актиноризе это в основном функция эндосимбионта, а не растения, как в клубеньках бобовых.

При высоком pO_2 необходимый для получения ATP уровень кислорода может обеспечиваться за счет диффузии без участия леггемоглобина, осуществляющего транспорт кислорода при низком pO_2 в клубеньках бобовых растений. Действительно, в клубеньках ряда актиноризных растений гемоглобины отсутствуют, но у *Myrica* и *Casuarina* обнаружены значительные количества гемоглобинов [Тјеркема, 1983], функции которых пока не установлены.

Аммоний – продукт функционирования нитрогеназы – поступает из клеток микросимбионта в клетки растения и ассимилируется сопряженной системой глутаминсингтазы (GS)/глутаматсингтазы. Это подтверждается включением ^{15}N у ольхи на ранних стадиях преимущественно в глутаминовую кислоту, глутамин и аспарагин [Becking, 1970] и обнаружением GS в растительной цитоплазме клубенька [Akkermans et al., 1983]. Аналогично ряду бобовых растений основными транспортными соединениями азота в листья у большинства актиноризных видов являются амиды (аспарагин и глутамин). Однако у *Alnus* spp. эту функцию выполняет цитруллин [Dixon, Wheeler, 1983].

Азотфиксация – энергоемкий процесс, но у ольхи в отличие от бобовых энергетические затраты на фиксацию N_2 не превышают затраты на ассимиляцию NH_4^+ или NO_3^- , и накопление биомассы азотфиксирующими растениями не тормозится [Sellstedt, Huss-Danell, 1986]. Энергетические потребности удовлетворяются за счет фотосинтеза в листьях актиноризного растения [Dawson, Gordon, 1979], в связи с чем наблюдается зависимость

азотфиксации от скорости фотосинтеза, листовой поверхности, интенсивности освещения, длины светового периода. Респираторное разложение фотоассимилята в актиноизных клубеньках обеспечивает энергию в форме АТР и углеродные скелеты, используемые эндофитом для фиксации N_2 . Природа соединений углерода и детали их метаболизма пока не изучены. Предполагают, что это не всегда сахара, так как они мало используются штаммами *Frankia* [Akkermans et al., 1983], не обладающими полным набором гликополитических ферментов и предпочитающими как источники углерода дикарбоновые и жирные кислоты, вероятно окисляемые с образованием энергии ферментами цикла трикарбоновых кислот, обнаруженными в культурах *Frankia* и в везикулах эндофита ольхи [Akkermans et al., 1983].

Параллельно с восстановлением N_2 нитрогеназа восстанавливает протоны с выделением водорода. Это уменьшает эффективность азотфиксации за счет потерь энергии (у многих бобовых растений потери достигают 40–60%) [Becking, 1982]. Однако, за исключением единичных случаев [Sellstedt et al., 1986], в актиноизных клубеньках обнаружены активные гидрогеназы, локализующиеся в везикулах эндофита [Benson et al., 1979] и улавливающие H_2 практически полностью, что значительно повышает эффективность симбиоза.

ГЕНЕТИКА АЗОТФИКСАЦИИ И СИМБИОЗА

Молекулярная биология и генетика *Frankia* spp. и их симбиоза с растениями только начинает развиваться (см. обзоры: [Добрица, 1985; Normand, Lalonde, 1986]). Многостадийное развитие клубеньков, сложные взаимодействия между микро- и макросимбионтом предполагают участие многих микробных и растительных генов.

Единственные гены, идентифицированные пока у *Frankia*, — это структурные гены нитрогеназы [Томашевский, Добрица, 1987], гомологичные оперону *nifHDK* *Klebsiella pneumoniae*. Недавно мы клонировали эти гены в клетках *Escherichia coli* и показали, что у штамма *Frankia* Cc1.17 в отличие от *Rhizobium* и *K. pneumoniae* гены *nifH*, *D* и *K*, вероятно, не образуют единого оперона: сцеплены только последовательности *nifH* и *D*. У другого изолята *Frankia* организация *nif*-генов несколько иная: сцеплены гены *nifD* и *K*, ген *nifH* локализован отдельно [Ligon, Nakas, 1985].

У многих *Rhizobium* spp. гены азотфиксации и симбиоза закодированы в больших плазмидах. Только у одного штамма *Frankia* обнаружена сравнительно большая плазмида и показана двойная локализация последовательностей, гомологичных *nifHDK*, — на плазмиде и в хромосоме [Simonet et al., 1986]. Плазмиды небольшого размера, найденные у других штаммов *Frankia*, не гибридизуются с *nif*-генами [Normand, Lalonde, 1986]. Вместе с тем мы обнаружили в везикулах из клубеньков ольхи комплекс гетерогенных по размерам циклических ДНК [Dobritsa, 1982] и недавно установили, что некоторые из них содержат последовательности, гомологичные генам *nifHDK*. Изучение этих ДНК позволило предположить [Добрица, 1985], что они образуются в результате перестроек генома эндосимбионта, индуцируемых взаимодействием с растением и/или дифференциацией везикул. Смысл перестроек пока не исключена

аналогия с перестройками, приводящими при дифференциации гетероцист у *Anabaena* к структурному объединению *nif*-генов, совпадающему по времени с экспрессией нитрогеназы [Golden et al., 1985].

Что касается других детерминантов азотф ﬁксирующего симбиоза, несомненно существуют гены хозяинской специфичности *Frankia*, ранние симбиотические гены (например, ответственные за скручивание корневых волосков растения, синтез фитогормонов, последовательные стадии образования клубеньков). Кандидатами на роль поздних симбиотических генов могут быть детерминанты дифференциации везикул, синтеза гемоглобина, гидрогеназы и т.д. За исключением некоторой гомологии с геном *nodC* [Drake et al., 1985], ДНК *Frankia* не гибридизуются с ранними симбиотическими генами *Rhizobium* [Томашевский, Добрица, 1987], определяющими деформацию корневых волосков растения и образование клубеньков. Это дополняет представления о глубоких различиях между двумя типами симбиоза.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АКТИНОРИЗНЫХ РАСТЕНИЙ

Растения с актиноризой в силу биологических особенностей ограниченно используются в сельском хозяйстве: в основном — облепиха, ягоды которой богаты витамином С и содержат масло, находящее широкое применение в медицине. Иногда зеленая масса растений используется на силос, жители некоторых районов употребляют в пищу ягоды лоха и шефердии. Однако роль актиноризных растений в лесном хозяйстве аналогична значению бобовых растений для сельского хозяйства. Не требуя азотных удобрений, растения с актиноризой накапливают значительную биомассу — источник многих ценных продуктов (древесины, смол, дубильных веществ, красителей, медикаментов, воска, луба), увеличивают одновременно плодородие почв, часто непригодных для выращивания других растений.

В зависимости от решаемых задач выделяют два основных направления использования актиноризных растений в лесоводстве [Tarrant, 1983]: с целью получения урожая и преимущественно для улучшения свойств экосистемы. В первом случае используют быстрорастущие древесные породы, достигающие значительных размеров, — ольху (в Европе и Америке) и казуарину (в Азии, Африке, Австралии). Их выращивают длительное время (25–30 лет) для получения древесины, применяемой в деревообрабатывающей, целлюлозно-бумажной и других отраслях, в строительстве, как высококалорийное топливо и т.д. С развитием современных технологий все большее значение приобретает выращивание этих пород в течение более короткого периода (5–15 лет) для получения биомассы и энергии. В обоих вариантах возможны смешанные посадки с другими цennыми древесными породами (тополь, сосна, эвкалипт), рост которых значительно ускоряется.

Для решения второй задачи пригодны все без исключения актиноризные растения. Их выращивают как вспомогательные культуры для обогащения почвы азотом под последующие посадки ценных древесных пород и сельскохозяйственных растений или в качестве подлеска одновременно с черным орехом, елью, ясенем, дубом, сосной, тополем, крыжовником. Особое значение имеет использование растений с актиноризой (самостоя-

тельно или в смешанных культурах) в целом комплекс мероприятий по стабилизации почв и улучшению их свойств: облесении песчаных дюн, склонов гор, почв, подвергаемых эрозии, рекультивации отвалов горных пород, освоении заболоченных и засоленных почв, вырубок, различных бесплодных земель, создании лесозащитных полос.

Решение задач интенсивного лесоводства без применения азотных удобрений требует оптимизации актиноризных симбиозов путем селекции хозяйственных растений с определенными свойствами и наиболее эффективных комбинаций растений и штаммов *Frankia* [Sellstedt et al., 1986]. Вместе с тем даже простая инокуляция посадочного материала гомогенатом корневых клубеньков или инфекционными культурами *Frankia* позволяет без существенных затрат значительно увеличить продуктивность актиноризных симбиозов [Houwers, Akkermans, 1981; Périnet et al., 1985]. Особен-но заметна стимуляция при внесении инокулята в бесплодные или нарушенные почвы, а также при первичной интродукции соответствующих растений. Использование чистых культур *Frankia* имеет ряд преимуществ по сравнению с применением гомогената клубеньков, благодаря чему *Frankia* spp. становятся объектом биотехнологического производства инокулята для актиноризных растений [Périnet et al., 1985].

Таким образом, изучение актиноризы вносит вклад в фундамент знаний о многообразии и эволюции азотфикссирующих симбиозов, в практику лесной и других сфер хозяйства; освоение природного резервуара генетического разнообразия и изменчивости *Frankia* может привести к улучшению реальных и созданию новых симбиотических систем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Добрица С.В. Молекулярная организация генома *Frankia* // Проблемы биохимии и физиологии микроорганизмов. Пущино, 1985. С. 294–302.

Калакуцкий Л.В., Париjsкая А.Н. Симбиотическая азотфиксация у небобовых растений и ее практическое применение // С.-х. биология. 1984. № 1. С. 93–102.

Томашевский А.Ю., Добрица С.В. Гибридизация ДНК актиномицетов рода *Frankia* со структурными генами нигрогеназы (nifHDK) *Klebsiella pneumoniae* и под-генами *Rhizobium meliloti* // Молекуляр. генетика, микробиология, вирусология. 1987. № 3. С. 27–32.

Akkermans A.D.L., van Dijk C. Non-leguminous root nodule symbioses with actinomycetes and *Rhizobium* // Nitrogen fixation. Oxford: Univ. press, 1981. Vol. 1. P. 57–103.

Akkermans A.D.L., Roelofsen W., Blom J., Huss-Danell K., Harkink R. Utilization of carbon and nitrogen compounds by *Frankia* in synthetic media and in root nodules of *Alnus glutinosa*, *Hippophaë rhamnoides*, and *Datisca cannabina* // Canad. J. Bot. 1983. Vol. 61, N 11. P. 2793–2800.

Baker D., Newcomb W., Torrey J.G. Characterization of an ineffective actinorhizal microsymbiont, *Frankia* sp. EuII (Actinomycetales) // Canad. J. Microbiol. 1980. Vol. 26, N 9. P. 1072–1089.

Becking J.H. Plant-endophyte symbiosis in non-leguminous plants // Plant and Soil. 1970. Vol. 32, N 3. P. 611–654.

Becking J.H. Endophyte and association establishment in non-leguminous nitrogen-fixing plants // Recent developments in nitrogen fixation. L.: Acad. press, 1977. P. 551–567.

Becking J.H. Nitrogen fixation in nodulated plants other than legumes // Advances in agricultural microbiology. L.: Butterworth, 1982. P. 89–100.

Benson D.R., Arp D.J., Burris R.H. Cell-free nitrogenase and hydrogenase from actinorhizal root nodules // Science. 1979. Vol. 205. P. 688–689.

Bond G. Taxonomy and distribution of non-legume nitrogen-fixing systems // Biological nitrogen fixation in forest ecosystems: Foundations and applications. The Hague: Nijhoff and Junk, 1983. P. 55–87.

Chaboud A., Lalonde M. Lectin binding on surfaces of *Frankia* strains // *Canad. J. Bot.* 1983. Vol. 61, N 11. P. 2889–2897.

Dawson J.O., Gordon J.C. Nitrogen fixation in relation to photosynthesis in *Alnus glutinosa* // *Bot. gaz.* 1979. Vol. 140S. P. S70–S75.

Dixon R.O.D., Wheeler C.T. Biochemical, physiological and environmental aspects of symbiotic nitrogen fixation // Biological nitrogen fixation in forest ecosystems: Foundations and applications. The Hague: Nijhoff and Junk, 1983. P. 107–171.

Dobritsa S.V. Extrachromosomal circular DNAs in endosymbiont vesicles from *Alnus glutinosa* root nodules // *FEMS Microbiol. Lett.* 1982. Vol. 15, N 2. P. 87–91.

Drake D., Leonard J.T., Hirsch A.M. Symbiotic genes in *Frankia* // Nitrogen fixation research progress. Dordrecht: Nijhoff, 1985. P. 147.

Golden J.W., Robinson S.J., Haselkorn R. Rearrangement of nitrogen fixation genes during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* // *Nature*. 1985. Vol. 314. P. 419–423.

Houwers A., Akkermans A.D.L. Influence of inoculation on yield of *Alnus glutinosa* in the Netherlands // *Plant and Soil*. 1981. Vol. 61, N 1–2. P. 189–202.

Huss-Danell K., Sellstedt A., Flower-Ellis A., Sjöström M. Ammonium effects on function and structure of nitrogen-fixing root nodules of *Alnus incana* (L.) Moench. // *Planta*. 1982. Vol. 156, N 4. P. 332–340.

Ligon J.M., Nakas J.P. Isolation and characterization of the genes from *Frankia* that code for the component I proteins of nitrogenase // Nitrogen fixation research progress. Dordrecht: Nijhoff, 1985. P. 188.

Meesters T.M. Localization of nitrogenase in vesicles of *Frankia* sp. Cc1.17 by immunogoldlabelling on ultrathin cryosections // *Arch. Microbiol.* 1987. Vol. 146, N 4. P. 327–331.

Miller I.M., Baker D.D. The initiation, development and structure of root nodules in *Elaeagnus angustifolia* L. (Elaeagnaceae) // *Protoplasma*. 1985. Vol. 128, N 2–3. P. 107–119.

Moiroud A., Gianinazzi-Pearson V. Symbiotic relationships in actinorhizae // Genes involved in microbe-plant interactions. Wien: Springer, 1984. P. 205–223.

Nesme X., Normand P., Tremblay F.M., Lalonde M. Nodulation speed of *Frankia* sp. on *Alnus glutinosa*, *Alnus crispa*, and *Myrica gale* // *Canad. J. Bot.* 1985. Vol. 63, N 7. P. 1292–1295.

Normand P., Lalonde M. The genetics of actinorhizal *Frankia*: a review // *Plant and Soil*. 1986. Vol. 90. P. 429–453.

Perinet P., Brouillet J.G., Fortin J.A., Lalonde M. Large scale inoculation of actinorhizal plants with *Frankia* // *Ibid.* 1985. Vol. 87, N 1. P. 175–183.

Sellstedt A., Huss-Danell K. Biomass production and nitrogen utilization by *Alnus incana* when grown on N_2 or NH_4 made available at the same rate // *Planta*. 1986. Vol. 167, N 3. P. 387–394.

Sellstedt A., Huss-Danell K., Ahlgqvist A.-S. Nitrogen fixation and biomass production in symbioses between *Alnus incana* and *Frankia* strains with different hydrogen metabolism // *Physiol. Plant.* 1986. Vol. 66, N 1. P. 99–107.

Simonet P., Haurat J., Normand P., Bardin R., Moiroud A. Localization of *nif* genes on a large plasmid in *Frankia* sp. strain ULQ0132105009 // *Mol. and Gen. Genet.* 1986. Vol. 204, N 3. P. 492–495.

Tarrant R.F. Nitrogen fixation in North American forestry: research and application // Biological nitrogen fixation in forest ecosystems: Foundations and applications. The Hague: Nijhoff and Junk, 1983. P. 262–277.

Tjeenkema J.D. Hemoglobins in the nitrogen-fixing root nodules of actinorhizal plants // *Canad. J. Bot.* 1983. Vol. 61, N 11. P. 2924–2929.

Torrey J.G., Callaham D. Structural features of the vesicle of *Frankia* sp. CplI1 in culture // *Canad. J. Microbiol.* 1982. Vol. 28, N 7. P. 749–757.

Wheeler C.T., Henson L.E., McLaughlin M.E. Hormones in plants bearing actinomycete nodules // *Bot. gaz.* 1979. Vol. 140S. P. S52–S57.

ЭНДОМИКОРИЗА БОБОВЫХ КУЛЬТУР

Г.С. Муромцев, Г.Н. Маршунова

Всесоюзный научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии, Ленинград

Симбиотические взаимоотношения между высшими растениями и грибами, образующими везикулярно-арбускулярную микоризу (ВАМ), привлекают внимание исследователей. Непрекращающийся интерес к эндомикоризе обусловлен широким распространением эндофитов в большинстве почв разных климатических зон, в том числе Советского Союза, их способностью инфицировать важнейшие сельскохозяйственные культуры и вследствие этого значительно улучшать минеральное, особенно фосфорное, питание растений [Муромцев и др., 1985; Селиванов, 1981; Науман, 1978].

Многочисленными исследованиями установлено, что у микоризованных растений резко усиливается поглощение из почвы фосфора, а также кальция, азота, калия, натрия, магния, железа, марганца, меди, бора, цинка, алюминия и серы [Buwalda et al., 1983; Harley, Smith, 1983; Mosse, 1973; Tinker, 1978]. Это связано с морфологическими особенностями эндомикоризных грибов. Развиваясь главным образом внутри корней, они также образуют негустой внешний мицелий, за счет которого значительно увеличивается поглощающая поверхность корневой системы и растения получают питательные вещества за пределами зоны корневых волосков. Это особенно важно для усвоения ионов, слабо диффундирующих в почве, главным образом фосфатов [Муромцев и др., 1985; Науман, 1978].

Положительное влияние эндомикоризы на рост и развитие растений первоначально было показано в опытах со стерильными почвами. А затем, начиная с работы Мосс и Хэймена [Mosse, Nauman, 1971], эффективность инокуляции эндофитами была подтверждена и в нестерильных почвах на различных сельскохозяйственных культурах, в том числе бобовых: вике, клевере (красном, белом, подземном), сое, люцерне, чине, кормовых бобах, фасоли, горохе, нуте и др. [Муромцев и др., 1985; Abbott, Robson, 1977; Owusu-Bennoah, Mosse, 1979; Tinker, 1978, 1982].

В результате было показано, что эндомикориза может играть особенно важную роль в питании растений на почвах низкого плодородия. Невысокое содержание в них азота и доступного фосфора лимитирует рост растений и микоризованные растения имеют преимущество перед немикоризованными, усиливая накопление ими биомассы.

Отмечаемое исследователями увеличение концентрации азота в микоризованных небобовых культурах также является результатом усиленного поступления этого элемента из почвы, так как эндомикоризные грибы не способны фиксировать азот атмосферы. Харли и Смит [Harley, Smith, 1983] считают, что это скорее всего вторичный, опосредованный эффект за счет повышения содержания в растениях фосфора.

Несколько иначе обстоит дело с бобовыми культурами, накопление азота в которых происходит благодаря симбиотической азотфиксации. Азотфиксация — энергоемкий процесс, в котором активность нитрогеназы

зависит от АТР. По-видимому, этим объясняется тот факт, что клубеньки содержат намного больше фосфора, чем корни, на которых они сформированы [Azcon-Aguilar, Barea, 1981]. Отсюда становится понятной зависимость многих бобовых культур от наличия эндомикоризы. Если немикоризованные бобовые растут на почвах, бедных фосфором, что часто клубеньки у них развиты слабо или вовсе отсутствуют. Улучшение снабжения растений фосфором за счет эндомикоризных грибов стимулирует образования клубеньков, что, в свою очередь, усиливает снабжение азотом и приводит к дальнейшей стимуляции роста растений [Asimi et al., 1980; Jackson, Mason, 1984, Ocampo, 1980].

Эндомикоризный симбиоз широко распространен среди бобовых, и из используемых в сельском хозяйстве культур только люпин (*Lupinus cosentini*) либо вовсе не образует ВАМ, либо иногда бывает слабомикотрофен. Возможно, это объясняется подавлением развития эндомикоризных грибов микотоксинами, содержащимися в этом растении. Кроме того, люпин, как известно, менее зависит от доступного фосфора, хорошо развиваясь на бедных этим элементом почвах. Именно наличие эндомикоризы позволяет бобовым успешно конкурировать с травами в природных сообществах, например на пастбищах [Azcon-Aguilar, Barea, 1981; Mosse et al., 1981].

Таким образом, оптимальное развитие бобовых обусловлено тройным симбиозом: растение – *Rhizobium* – эндомикоризные грибы.

В отличие от *Rhizobium* ВАМ-грибы не обладают специфичностью и могут инфицировать очень широкий круг растений-хозяев. Например, выделенные нами из корней земляники и кукурузы эндофиты вступали в симбиоз с овсом, ячменем, викой и соей.

Однако все же определенные штаммы лучше других снабжают растения элементами питания и влияют на их рост, как это, например, было показано в опытах с люцерной [O'Bannon et al., 1980]. Структура почвы, доступные элементы питания, температура, влажность, освещение, растение-хозяин – все эти и другие факторы играют роль в проявлении эффективности симбиоза. В результате микоризный гриб, который был эффективен с одним растением-хозяином при определенных условиях, может не оказывать положительного влияния на другого хозяина при тех же условиях или на того же хозяина, но при других условиях [Buwalda et al., 1983; Owusu-Bempah, Mosse, 1979]. Отсюда следует необходимость тщательного подбора партнеров симбиоза.

Все исследователи, работающие с эндомикоризой, отмечают, что микоризованные растения обычно растут быстрее и выглядят здоровее неинфицированных на почвах с низким плодородием. Дополнительная инокуляция бобовых *Rhizobium* еще более усиливает этот эффект [Harley, Smith, 1983; O'Bannon et al., 1980; Smith F., Smith S., 1981].

Последние исследования тройного симбиоза сои, бобов, арахиса, клевера и некоторых других культур, проведенные в различных странах, подтвердили, что фиксация азота, урожай растений, содержание в нем фосфора и азота выше, когда растения инфицированы селекционными культурами эндомикоризообразующих грибов. Приведем результаты некоторых опытов.

При выращивании сои в гамма-простерилизованной неудобренной почве инокуляция семян *Rhizobium japonicum* шт. G3 и грибом *Glomus mosseae* (в виде инфицированных корней лука) значительно (на 140–177%) усилила общую нитрогеназную активность растения, имеющего клубеньки. В разных вариантах опыта урожай повысился на 134–147%, почти в три раза увеличилась масса клубеньков, улучшилось поступление фосфора в растения, снизилось соотношение корней и надземной части [Asimi et al., 1980].

В Канаде сравнили рост 20 различных культур в полевых условиях на необработанной и обработанной метилбромидом почве (для устранения аборигенных эндофитов). Подавляющее большинство из них, в том числе горох посевной, фасоль обыкновенная и кормовые бобы, гораздо лучше росли на исходной почве, содержащей эндомикоризные грибы [Plenchette et al., 1983]. В Нигерии на участках поля, где почва была простерилизована формальдегидом, инокуляция вигны грибом *Glomus mosseae* привела к увеличению урожая бобов и значительному повышению содержания в них общего азота (с 955 мг/растение в контроле до 2562 мг/растение в опыте), фосфора (с 21,4 мг до 58,3 мг), увеличению массы клубеньков (с 234 до 648 мг/растение). В нестерильных условиях эти показатели у микоризованных растений также были выше, но они находились в обратной корреляции с урожаем [Islam et al., 1980, 1981].

Природа "экстра"-азота в растениях не всегда может быть четко установлена. Однако применение изотопа ^{15}N и ацетиленового метода в ряде опытов позволяет выяснить: происходит ли накопление азота за счет усиленной азотфиксации или за счет интенсивного поступления его из почвы. У хорошо развитых растений оба эти фактора играют, вероятно, одинаково важную роль.

Как правило, эффективность симбиоза выше в стерильных почвах из-за отсутствия конкуренции испытуемых микроорганизмов с аборигенными. Вместе с тем, испанскими исследователями [Azcon-Aguilar, Varela, 1981] было показано, что, несмотря на наличие в почве спор грибов рода *Glomus*, дополнительная инокуляция *Medicago sativa* эндофитом *G. mosseae* положительно отразилась на росте растений. Возросла надземная масса, содержание в ней азота, фосфора и калия. Инокуляция одними клубеньковыми бактериями *Rhizobium meliloti* также стимулировала рост растений. Но при совместном применении гриба и бактерий положительный эффект усиливался, при этом масса растений увеличивалась более чем в два раза.

Этими же авторами проведены интересные исследования с *Hedysarum coronarium* — бобовым растением, образующим большую вегетативную массу и перспективным для корма скота [Azcon-Aguilar et al., 1982; Azcon et al., 1985]. В естественных условиях местообитания (Средиземноморье) эта фуражная культура имеет эндомикоризу и клубеньки, из которых были выделены 7 штаммов *Rhizobium*. Ими инокулировали растения совместно с эндомикоризным грибом *Glomus mosseae* и без него на фоне азотных и фосфорных удобрений. Результаты, полученные с микоризованными растениями, показали, что некоторые штаммы *Rhizobium* усилили их рост и минеральное питание в большей степени, чем применение азотного удобрения. У немикоризованных растений различия между вариантами не были значительными. Установлена тесная прямая связь между инфекционностью и

эффективностью испытанных штаммов *Rhizobium*, а также уровнем микоризной инфекции. То есть выявлена зависимость развития *Nedysarum coronarium* от присутствия обоих микробных симбионтов, что необходимо учитывать в случае их культивирования в новых местах обитания.

Положительные результаты от микоризации получены также в ряде других стран. В Новой Зеландии клевер красный хорошо рос в нестерильной почве. Однако добавление достаточного количества инокуляционного материала (из расчете 2 т/га), приготовленного на основе двух селекционных культур грибов *Glomus fasciculatum* и *Gigaspora margarita*, на 52% усилило его рост [Powell, 1981].

Нами в вегетационном опыте проведено изучение эффективности некоторых эндофитов: *Glomus mosseae*, *G. fasciculatum* (полученных из Великобритании) и выделенных из корней кукурузы и земляники *Glomus* sp. 2 и *Glomus* sp. 7 [Муромцев и др., 1981]. Ими инокулировали вику сорта Немчиновская 72 отдельно и совместно с *R. leguminosarum* biovar. *viciae* шт. 0610. Растения выращивали до фазы массового цветения в дерново-подзолистой слабоокультуренной почве с содержанием гумуса 1,1%, P_2O_5 – 8,3 мг на 100 г почвы, pH_{KCl} 4,9.

Данные табл. 1 показывают неоднозначность влияния испытанных эндофитов на растения. Два из них, *Glomus* sp. 2, *G. sp. 7*, на 26,6–38,4% увеличили надземную массу вики и на 17,5% содержание в ней азота. При тройном симбиозе эти показатели увеличились, кроме того, на 20% возросла концентрация азота в растениях, инокулированных *G. mosseae*. Все грибы, особенно *Glomus* sp. 2, способствовали значительному накоплению в биомассе фосфора. А по фону *Rhizobium* эффективным был только *G. fasciculatum*.

Помимо описанного влияния эндомикоризы на растения, предполагают также, что она может оказывать стимулирующий эффект посредством выделения гормоноподобных веществ, которые обнаруживаются в микоризованных растениях в больших количествах. Тинкер [Tinker, 1978, 1982] указывает, что в литературе имеется очень мало сведений об улучшении роста растений за счет ВАМ, в которых вполне определено было бы доказано отсутствие эффекта улучшения их питания.

Подтверждением гормонального эффекта эндомикоризы на растения являются результаты другого вегетационного опыта, проведенного нами с викой сорта Льговская, выращиваемой на дерново-подзолистой слабоокультуренной почве (гумус 1,8%, P_2O_5 – 17 мг на 100 г почвы). Совместная инокуляция семян *R. leguminosarum* biovar. *viciae* шт. 0610 с одним из трех эндомикоризных грибов *G. mosseae*, *G. sp 2*, *G. sp 7* привела к более раннему и более обильному цветению опытных растений (табл. 2). Эндофиты *G. mosseae* и *G. sp. 7* на 17,4 и 15% увеличили надземную массу, не изменив в ней содержание азота. Количество же накопленного фосфора находилось в обратной зависимости от урожая.

Таким образом, несмотря на наличие в почвах аборигенных клубеньковых бактерий и эндомикоризных грибов, применение селекционных культур этих микроорганизмов оказывает положительное действие на бобовые. Но характер влияния одних и тех же потенциально эффективных культур эндофитов на растения может быть различным в зависимости от условий проведения опытов.

Таблица 1

Влияние инокуляции эндомикоризными грибами и *Rhizobium* на продуктивность вики сорта Немчиновская 72 на дерново-подзолистой слабоокультуренной почве (вегетационный опыт)

Эндофит	Воздушно-сухая надземная масса, г/сосуд		Содержание азота в надземной массе, %		Содержание фосфора в надземной массе, мг Р/1 г	
	1	2	1	2	1	2
Без инокуляции	3,89	4,30	1,28	1,41	0,97	2,16
<i>G. mosseae</i>	4,13	5,16	1,38	1,69	1,81	2,38
<i>G. fasciculatum</i>	3,96	5,07	1,21	1,63	1,98	2,65
<i>Glomus</i> sp. 2	4,94	6,21	1,50	1,89	2,95	2,07
<i>Glomus</i> sp. 7	5,50	5,80	1,50	1,74	2,15	2,22
HCP _{0,95}	0,95	1,25	0,19	0,25	0,25	0,33

Примечание. 1 – без *Rhizobium*; 2 – инокуляция *Rhizobium*.

Таблица 2

Влияние совместной инокуляции эндомикоризными грибами и *Rhizobium* на продуктивность вики сорта Льговская на дерново-подзолистой слабоокультуренной почве (вегетационный опыт)

Эндофит	Количество цветков, среднее на 12 растений	Воздушно-сухая надземная масса, г/сосуд	Содержание в надземной массе	
			азота, %	мг Р/1 г
Без инокуляции	16	17,12	2,89	3,16
<i>G. mosseae</i>	32	20,10	2,91	2,71
<i>Glomus</i> sp. 2	35	16,97	2,87	3,29
<i>Glomus</i> sp. 7	33	19,78	2,83	3,00
HCP _{0,95}	5	2,48	0,21	0,60

Вместе с тем, несмотря на бесспорную эффективность микоризации бобовых и других культур, практическое освоение этого приема сталкивается с большими трудностями. Это связано с тем, что эндомикоризные грибы, являясь облигатными симбионтами, не растут на искусственных питательных средах, что затрудняет разработку технологий производства соответствующих биопрепараторов. В настоящее время эндомикоризные грибы применяются преимущественно в виде почвенно-корневых смесей, насыщенных определенной культурой эндофита, что предопределяет довольно высокие нормы их внесения – 2–3 т/га [Муромцев и др., 1985]. В целях их снижения и успешного создания тройного симбиоза в Великобритании разработали и применили комплексную форму инокулюма [Наутман et al., 1985]. В смесь почвы, торфа и фосфорного удобрения вносятся эндомикоризные грибы и *Rhizobium*. Из полученного материала изготавливают комочки вместе с семенами клевера. Пре-

имуществом предлагаемого метода является сконцентрированность инокуляма вблизи прорастающих семян, более раннее инфицирование корней селекционными микроорганизмами, удобство транспортировки инокуляма после его высушивания и потенциальная возможность его машинного применения. Однако такая форма инокуляма пригодна только для растений, имеющих мелкие семена.

Учитывая отмеченные трудности, применение эндомикоризных грибов рекомендуют пока на ограниченных площадях, например, при биологической рекультивации земель. Эффективность тройного симбиоза вики при сельскохозяйственном освоении рекультивированных грунтов Подмосковного бороугольного бассейна наглядно показано в исследованиях Г.С. Муромцева и Н.В. Зольниковой [1985].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Муромцев Г.С., Зольникова Н.В. О возможности применения эндомикоризных грибов при биологической рекультивации земель // С.-х. биология. 1985. № 9. С. 26–30.

Муромцев Г.С., Маршунова Г.Н., Павлова В.Ф., Зольникова Н.В. Роль почвенных микроорганизмов в фосфорном питании растений // Успехи микробиологии. М.: Наука, 1985. Т. 20. С. 174–189.

Муромцев Г.С., Якоби Л.М., Маршунова Г.Н., Федорова Н.Н. Повышение урожая овса и содержания в нем фосфора под действием эндомикоризных грибов // Докл. ВАСХНИЛ. 1981. № 6. С. 3–5.

Селиванов И.А. Микосимбиотрофизм как форма консортивных связей в растительном покрове Советского Союза. М.: Наука, 1981. 229 с.

Abbott L.K., Robson A.D. Growth stimulation of subterranean clover with vesicular arbuscular mycorrhizas // Austral. J. Agr. Res. 1977. N 28. P. 639–649.

Azimi S., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. Influence of increasing soil phosphorus levels on interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizae and Rhizobium in soybeans // Canad. J. Bot. 1980. Vol. 58. P. 2200–2205.

Azcon-Aguilar G., Barea J.M. Field inoculation of *Medicago* with va-mycorrhiza and *Rhizobium* in phosphate-fixing agricultural soil // Soil Biol. and Biochem. 1981. Vol. 13, N 1. P. 19–22.

Azcon-Aguilar C., Barea J.M., Olivares J. Mycorrhizal infection of *Hedysarum coronarium* as affected by rhizobial strain and combined nitrogen // Les Colloques de l'INRA. Dijon, 1982. P. 195–198.

Azcon R., Barea J.M., Azcon-Aguilar C., Diaz-Rodriguez R.M. Effect of mycorrhizal inoculation on N-fixation by a forage legume under field conditions as evaluated by using a ^{15}N technique // I Europ. Symp. on Micorrhizae: Abstracts, France. Dijon, 1985. P. 27.

Buwalda J.G., Stribley D.P., Tinker P.B. Increased uptake of anions by plants with vesicular-arbuscular mycorrhizas // Plant and Soil. 1983. Vol. 71. P. 463–467.

Harley J.L., Smith S.E. Mycorrhizal Symbiosis. L.: Acad. press, 1983. 483 p.

Hayman D.S. Encomycorrhiza // Interaction between non-pathogenic soil microorganisms and plants. N.Y.: Acad. press, 1978. P. 401–442.

Hayman D.S., Day J.M., Oye M. Dial inoculated of white clover // I Europ. Symp. on Mycorrhizae: Abstracts, France. Dijon, 1985. P. 29.

Islam R., Ayanaba A. Growth and yield responses of cowpea and maize to inoculation with *Glomus mosseae* in sterilized soil under field conditions // Plant and Soil. 1981. Vol. 63. P. 505–508.

Islam R., Ayanaba A., Sanders F.E. Response of cowpea (*Vigna unguiculata*) to inoculation with va-mycorrhizal fungi and to rock phosphate fertilization in some unsterilized Nigerian soils // Ibid., 1980. Vol. 54. P. 107–117.

Jackson R., Mason Ph. Mycorrhiza // Inst. Biol. Stud. Biol. 1984. N 159. P. 1–60.

Mosse B. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza // Annu. Rev. Phytopathol. 1973. Vol. 11. P. 171–196.

Mosse B., Hayman D.S. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. II. In unsterile soils // *New Phytol.* 1971. Vol. 70, N 29. P. 29–34.

Mosse B., Stribley D.P., Le Tacon F. Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi // *Adv. Microbiol. Ecol.* 1981. Vol. 5. P. 137–210.

O'Bannon J.H., Evans D.W., Peadeen R.N. Alfalfa varietal response to seven isolated of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi // *Canad. J. Plant Sci.* 1980. Vol. 60. P. 859–863.

Owusu-Bennoah E., Mosse B. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza // *New Phytol.* 1979. Vol. 83. P. 671–679.

Ocampo J.A. Mycorrhizas VA. II. Efecto sobre el crecimiento de las plantas // *An. edafol. y agrobiol.* 1980. Vol. 39, N 5/6. P. 1049–1069.

Plenchette C., Fortin J.A., Furlan V. Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions // *Plant and Soil.* 1983. Vol. 70. P. 199–209.

Powell C.L. Effect of inoculum rate on mycorrhizal growth responses in pot-grown onion and clover // *Ibid.* 1981. Vol. 62. P. 231–239.

Smith F.A., Smith S.E. Mycorrhizal infection and growth of *Trifolium subterraneum*: comparison of natural and artificial inocula // *New Phytol.* 1981. Vol. 88. P. 311–325.

Tinker P.B. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizas on plant nutrition and plant growth // *Physiol. végét.* 1978. Vol. 16, N 4. P. 743–751.

Tinker P.B. Mycorrhizas: the present position // *Wither Soil Res. XII Intern. Congr. Soil. Sci.* New Delhi, 1982. P. 150–166.

II. АССОЦИАТИВНАЯ ФИКСАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА

УДК 576.8.095.312:576.8.095.38:633.527.2

АЗОТФИКСИРУЮЩИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ НА КОРНЯХ НЕБОБОВЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Л.Ф. Васюк

Всесоюзный научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии, Ленинград

Интерес к ассоциативной азотфиксации в последнее время объясняется многими причинами, и одна из них — стремление увеличить долю "биологического" азота в урожае небобовых растений, имеющих важное народнохозяйственное значение, за счет "дешевого" азота атмосферы, сократив тем самым применение дорогостоящих азотных удобрений, ведущих к загрязнению окружающей среды [Мищустин, 1985]. Использование ацетиленового метода в почвенно-микробиологических исследованиях позволило установить, что в природе существует около 12 тысяч растений различных семейств, способных к ассоциативной азотфиксации с почвенными микроорганизмами. Фиксация атмосферного азота обнаружена у представителей семейств злаков, крестоцветных, зонтичных, сложноцветных, пасленовых, гречишных, бурачниковых и др. [Neuga, Dobereiner, 1977; Venkataраман, 1982; Берестецкий, Васюк, 1983; Емцев и др., 1985; Dart, 1986].

Изучена способность к ассоциативной азотфиксации в условиях микрорегиональных, вегетационных, полевых опытов у интактных растений с использованием герметичных камер, на почвенных монолитах с растениями, на сегментах корней, у микроорганизмов ризосфера и ризопланы. Установлено, что не только в тропических и субтропических зонах, но и в условиях умеренного климата многие растения стимулируют развитие азотфикссирующих микроорганизмов в зоне корня. Размеры фиксации атмосферного азота в ассоциациях корней небобовых с диазотрофами очень различны и, согласно литературным данным, в зависимости от вида растений и климатических зон колеблются в пределах от 3 до 170 кг/га · год [Vose, 1983].

Отмечены три ассоциации, способные к значительному накоплению азота атмосферы в зоне ризосфера, — это рис, сорго, сахарный тростник. Наши исследованиями показано широкое распространение диазотрофов на корнях небобовых культур, но не всегда при этом можно было определить наличие нитрогеназной активности в системах растения—микрооргани-

низмы. Наиболее высокой скоростью восстановления ацетилена характеризовались ризосфера и ризоплан риса и райграса однолетнего. Значительная нитрогеназная активность наблюдалась на корнях ценхруса и проса. Менее активна была ризоплана яровой пшеницы, мятыка, тимофеевки. Только при создании благоприятных условий для жизнедеятельности микроорганизмов (инкубация корней в модифицированной среде Доберейнер – DN) резко возрастала нитрогеназная активность микрофлоры ризопланы кукурузы, озимой ржи, борщевика, маралього корня, катрана, окопника. Приведенные данные свидетельствуют о том, что сам факт протекания процесса ассоциативной азотфиксации возможен в ризосфере и на корнях не только однодольных, но и двудольных растений. Начало проявления нитрогеназной активности зависело от вида растений, фазы его развития.

Изучение нитрогеназной активности сообществ микроорганизмов в различных зонах корня риса показало, что наиболее высокая активность наблюдалась у микрофлоры, населяющей корни у узла кущения [Берестецкий, Васюк, 1983]. Распространение диазотрофов более всего изучено в ризосфере, ризоплане и внутренней ризоплане, так называемой гистосфере, риса. Исследования показали, что наиболее высокий процент азотфиксаторов наблюдается в гистосфере – 81% бактерий от общего числа бактерий, населяющих эту зону и имеющих нитрогеназную активность, тогда как в ризоплане – 71%, в ризосфере – 2,5% [Watanabe, 1979].

В ризосфере и на корнях небобовых растений обнаружены азотфиксирующие бактерии, относящиеся к родам: *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Dexxia*, *Aquaspirillum*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* и др. Список азотфиксаторов, выделенных с корней растений и почвы ризосферы, непрерывно пополняется [Balandreau, 1983]. В зависимости от вида растения и типа почвы среди бактериальных компонентов ассоциаций доминируют определенные виды азотфиксаторов. Так, в ризосфере сахарного тростника – *Beijerinckia indica*, на корнях *Paspalum notatum* – *Azotobacter paspali*, в ризосфере *Digitaria decumbens* – *Azospirillum spp.*, у *Eragrostis ferruginea* – *Azotobacter* [Patriquin et al., 1983]. Для изоляции азотфиксирующих микроорганизмов с корней небобовых растений нами были применены методы, позволяющие выделять бактерии на среде DN с поверхности и внутренних зон корня при отмыке и поверхностной стерилизации корней этиловым спиртом или суплемой определенной концентрации [Берестецкий и др., 1985б].

Применяемые методы позволили нам выделить из ризопланы риса, кормовых трав и других растений, произрастающих на дерново-подзолистой почве, черноземе, сероземе, – агробактерии, акваспириллы, энтеробактер, эрвиины, азоспириллы, флавобактерии. Из ризопланы райграса однолетнего выделен артробактер, в гистосфере кукурузы доминировала микобактерия, в гистосфере риса – родоспирилла. В ризоплане небобовых растений на дерново-подзолистой почве и черноземах наибольшим видовым разнообразием была представлена группа акваспирилл [Берестецкий и др., 1985б]. Тип почвы, ее биологическая активность, характер агротехнических воздействий определяли во многом видовое разнообразие диазотрофов на корнях различных растений. Так, азотфиксирующая активность, определенная у интактных растений риса и пшеницы, растущих на дерново-подзолистой почве, черноземе, лугово-черноземовидной почве и серо-

земе, была наиболее высокой у растений на сероземе и минимальной на дерново-подзолистой почве.

Наиболее активные и эффективные микроорганизмы были обнаружены у риса и райграса, вступающих в активные азотфикссирующие ассоциации с микроорганизмами. Для идентификации изолятов, отобранных по показаниям нитрогеназной активности как в чистых культурах, так и в ассоциациях с растениями *in situ*, были изучены морфолого-культуральные, физиолого-биохимические, хемотаксономические признаки, электронно-микроскопические и геносистематические показатели [Берестецкий и др., 1985а].

Среди бактериальных компонентов азотфикссирующих ассоциаций большее внимание исследователями уделяется бактериям рода *Azospirillum*. Эти бактерии обнаружены в почвах южных и северных широт, особенно многочисленны они в почвах тропиков, при продвижении к северу их количество снижается. Судя по численности, основным местом их обитания является поверхность корней. Азоспириллы обнаружены в ризоплане многих небобовых растений. Они всегда присутствуют как эпифиты на семенах злаков и интенсивно размножаются при их прорастании [Калининская, Редькина, 1981]. Изотопным методом доказано, что азот, фиксируемый этими бактериями, становился доступным растениям [Neuya, Dobereiner, 1977].

Нами при анализе корней риса и пшеницы, произрастающих на различных типах почв разной степени окультуренности, были обнаружены азоспириллы. В значительном количестве они находились в ризоплане обоих растений на целинных почвах. Азоспириллы редко встречались в ризоплане сорго в Ростовской области, маралього корня и кормовых злаковых трав в Ленинградской области. К настоящему времени в коллекции лаборатории ВНИИ Сельхозмикробиологии имеется ряд штаммов азоспирилл, из которых наибольший интерес представляют и лучше изучены штаммы, выделенные из ризопланы риса (134, 137, 138), пшеницы (РИП-21, РИП-22, РИП-23). Содержание ГЦ-дара в ДНК этих бактерий, определенное методом тепловой денатурации по Мармуру, составило 69–70%. На этом основании штаммы были отнесены к роду *Azospirillum*. Окончательное подтверждение систематического положения бактерий и их видовая принадлежность были определены методом молекулярной гибридизации ДНК исследуемых штаммов с ДНК типовых штаммов — *A. brasiliense* Sp 7 и *A. lipoferum* 59в на нитроцеллюлозных мембранных фильтрах [Хальчицкий, Турова, 1986]. Высокий процент гомологии между исследуемыми штаммами и типовым штаммом *A. lipoferum* 59в указывает на принадлежность их к виду *A. lipoferum* (табл. 1).

За 1978–1986 гг. из ризопланы и гистосферы небобовых растений нами выделено более 1000 изолятов, в которых была определена азотфикссирующая способность по показаниям нитрогеназной активности, полученным ацетиленовым методом, в чистых культурах с использованием среды DN в различных модификациях. Проверка активности была осуществлена в условиях стерильных микровегетационных опытов с райграсом однолетним на вермикулите со средой Красильникова–Кореняко без азота [Берестецкий, Васюк, 1983].

В условиях многочисленных вегетационных опытов, проведенных как

Таблица 1

Таксономическое изучение азоспироил методом молекулярной гибридизации ДНК-ДНК

Штамм	Содержание ГЦ в ДНК, мол.% (± 1)	Степень гомологии ДНК, %	
		<i>A. brasiliense</i> Sp 7	<i>A. lipoferum</i> 59b
<i>A. brasiliense</i> Sp 7	70,1	100	47
<i>A. lipoferum</i>			
59b	70,0	28	100
шт. 134	69,0	42	77
шт. 137	70,5	46	83
шт. 138	70,3	35	80
шт. РИП-21	70,0	26	87
шт. РИП-23	70,2	32	88
RS 3	70,0	27	83
RS 7	70,0	40	100

за рубежом, так и в Советском Союзе с рисом, кукурузой, пшеницей, сорго, райграком, маральным корнем, осуществлено изучение взаимоотношений ассоциативных азотфиксаторов с растениями. По данным величин урожая зеленой массы, зерна, массы корней, по содержанию общего азота судили об эффективности различных групп диазотрофов. Наиболее удобным объектом изучения эффективности бактерий в наших исследованиях явился рис сорта Дубовский 129 в качестве тест-культуры.

Первые опыты по изучению влияния инокуляции комплексом корневых диазотрофов различных растений — кукурузы, проса, сорго, риса, райгракса — на дерново-подзолистой почве не дали положительных результатов без внесения минеральных удобрений. Микровегетационный стерильный опыт с 6 видами кормовых трав, инокулированных корневыми диазотрофами по фону различных доз азота и без него, показал избирательное отношение растений к бактериализации в зависимости от содержания азота в субстрате [Васюк, 1985а]. Все это заставило нас при проведении вегетационных опытов проводить инокуляцию растений по фону небольших доз минерального азота для стимуляции развития бактерий при создании азотфиксирующих ассоциаций и формирования у растений фотосинтетического аппарата.

Влияние инокуляции различными штаммами ассоциативных азотфиксаторов прежде всего сказалось на повышении интенсивности процесса. Так, в опытах с рисом азотфикссирующая активность, определяемая неоднократно в период кущения, у интактных растений при применении герметичных камер, возросла в 2–10 раз по сравнению с контрольными растениями, семена которых были обработаны автоклавированной культурой или средой для выращивания бактерий. Определение азотфикссирующей активности на сегментах корней у пшеницы сорта Ленинградка в течение всего вегетационного периода показало, что в период кущения нитрогеназная активность пшеницы, инокулированной шт. 137 *A. lipoferum*, была в 30 раз выше контроля без инокуляции.

Обобщая результаты вегетационных опытов, можно прийти к выводу о несомненном влиянии диазотрофов на урожай растений, их азотный об-

Таблица 2

Азотфикссирующая активность и эффективность корневых диазотрофов в условиях вегетационных опытов с рисом и пшеницей

Вид бактерий	Рис сорта Дубовский 129					
	Нитрогеназная активность, нМ этилена		Эффективность (прибавка к контролю), %			
			Вегетативная масса		Накопление азота	
	in vitro ч/флакон	in situ сут/сосуд	Надземная масса	Корни	Надземная масса	Корни
Arthrobacter mysorens	72	6070	5,0	0	63,7	—
Flavobacterium sp.	238	40000	0	0	54,2	—
Mycobacterium rubi- acearum	60	2900	17,9	103,0	50,2	90,9
Rhodospirillum rubrum	64	3900	13,0	9,1	146,0	30,0
Azospirillum lipoferum	3400	5200	5,8	11,6	74,3	17,7
Aquaspirillum serpens	110	840	12,9	15,0	81,1	148,9
Erwinia herbicola	30	905	14,1	7,5	117,0	137,4

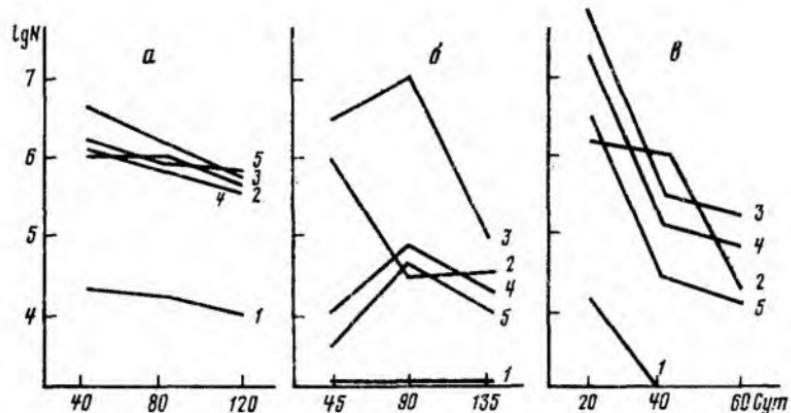
мен. В период развития растений (фаза кущения, начала трубкования) влияние бактеризации сказывалось прежде всего на увеличении содержания азота как в надземной массе, так и в корнях. Величина надземной массы изменялась за этот период мало. Что же касается влияния ассоциативных азотфиксаторов на массу корней, то здесь к однозначным выводам прийти нельзя. Под влиянием инокуляции накопление азота в надземной массе возрастало на 12–50%, в корнях – на 15–75%. Так, среди группы азотфикссирующих спиропл., в которую входили представители родов *Aquaspirillum*, *Azospirillum*, *Rhodospirillum*, больше всего способствовали накоплению азота штаммы вида *Aq. serpens*. Активное участие в азотном питании растений принимали представители рода *Rhodospirillum* (табл. 2). Влияние азоспиропл. менее сказывалось на накоплении азота в первый период развития риса. Из бактерий других систематических групп можно отметить штаммы артробактера, эрвии, флавобактерии, микобактерии, способствующих значительному накоплению азота в вегетативной массе растений.

Положительное влияние инокуляции диазотрофами на массу корней отмечено при работе с песчаными культурами. Значительное увеличение массы корней при этом наблюдалось в вариантах с инокуляцией микобактерией (+103%), некоторыми штаммами акваспиропл. (+72–80%) [Васюк, 1985б]. Под влиянием обработки семян риса сортов Дубровский 129 и Солнечный, произраставших на хорошо окультуренной дерново-подзолистой почве, штаммами флавобактерии, родоспиропл., азоспиропл. нами было замечено достоверное уменьшение массы корней на протяжении всего периода развития риса, особенно в вариантах с инокуляцией азоспиропл. (до 40%). Подобное явление было отмечено при инокуляции сорго и манго корня. В опытах с пшеницей отрицательного влияния инокуляции на массу корней обнаружено не было.

Пшеница								
Мягкая пшеница				Твердая пшеница				
Лютесценс 62		Ленинградка		Мелянопус 26		Алтайка		
Эффективность (прибавка к контролю), %								
Урожай зерна	Накопление азота	Урожай зерна	Накопление азота	Урожай зерна	Накопление азота	Урожай зерна	Накопление азота	Урожай зерна
16,7 0 95,1	66,0 22,6 38,9	21,8 2,7 1,7	65,2 13,0 19,9	42,4 16,5 3,8	87,8 38,3 31,0	34,4 32,8 0	17,9 4,1 0	
30,3 32,1	28,3 64,3	10,7 0	26,1 12,2	28,8 4,2	81,5 28,8	49,6 0	17,9 0	

Штаммы ассоциативных азотфиксаторов, показавшие высокую эффективность с рисом были испытаны в вегетационном опыте с пшеницей на хорошо окультуренной дерново-подзолистой почве с внесением половинной дозы азота по Прянишникову дважды за вегетационный период. Результатами опыта установлено, что наиболее отзывчивыми на инокуляцию оказались экстенсивные сорта мягкой (сорт Лютесценс 62) и твердой (сорт Мелянопус 26) пшеницы. Менее отзывчивы интенсивные сорта – Ленинградка и Алтайка. Из 10 испытуемых штаммов бактерий – штаммы артробактера и родоспиропл. – вступили в эффективную ассоциацию со всеми 4 сортами и способствовали повышению урожая зерна на 16–42% и на 10–49% (табл. 2). Штамм азоспиропл. оказал положительное действие только в ассоциации с сортами мягкой пшеницы, штамм флавобактерии был более эффективен с сортами твердой пшеницы. Значительные прибавки урожая зерна у сорта Лютесценс 62 были получены при бактеризации семян штаммом микобактерии (+85%). Применение ассоциативных азотфиксаторов положительно сказывалось и на повышении содержания и накопления общего азота в зерне. Увеличение урожая происходило как за счет увеличения числа колосьев, так и за счет увеличения массы зерна в зависимости от сорта пшеницы [Васюк, Иванов, 1986].

Несомненный положительный эффект ассоциативных азотфиксаторов, наблюдавшийся в опытах с различными сельскохозяйственными культурами, выдвинул вопрос о приживаемости штаммов диазотрофов, и в частности азоспиропл., на корнях растений. К сожалению, мало используются генетические маркеры для выявления внесенных штаммов азоспиропл. из-за высокой их чувствительности к антибиотикам, серологический метод тоже дает неудовлетворительные результаты [Dart, 1986]. По мнению Доберейнер, большую роль в эффективности азоспиропл. играет растение-хозяин. Так, бактерии, выделенные из ризопланы кукурузы, были эффективны



Численность азоспирилл в ризоплане риса (а), сорго (б) и райграса (в)

1 – контроль; 2 – *A. brasiliense*, шт. Sp. 7; 3 – *A. lipoferum* шт. 134; 4 – *A. lipoferum* шт. 137; 5 – *A. lipoferum* шт. 138

в опытах с кукурузой и мало эффективны с кормовыми травами, и наоборот [Baldani et al., 1986]. Изучение приживаемости 4 штаммов азоспирилл, выделенных Доберейнер из ризопланы тропической злаковой травы (*A. brasiliense* Sp. 7) и нами из ризопланы риса (*A. lipoferum* шт. 134, 137, 138), на корнях риса, пшеницы, сорго и райграса по фазам развития растений было проведено сотрудником лаборатории А.Е. Хальчицким. По его данным, при анализе песчаных культур азоспириллы преобладали в ризоплане растений, а не в ризосфере и гистосфере. Наиболее благоприятные условия для жизнедеятельности этой группы бактерий наблюдались в период кущения и в ризоплане риса (см. рисунок).

Активность процесса ассоциативной азотфиксации и эффективность инокуляции диазотрофами во многом определяются генотипом растения и зависит от уровня азотного питания. Не только вид, но и сорт растений существенно изменяют активность азотфикссирующих ассоциаций, как указывается в работах различных исследователей [Avivi, Feldman, 1982; Boddey, Dobereiner, 1982; Умаров, 1982].

С использованием стабильного изотопа азота ^{15}N в условиях вегетационных опытов в песчаных культурах с рисом и сорго было показано, что основная масса фиксированного азота в первые два месяца развития растений накапливалась в субстрате. До 90% общего азота в песке составлял азот биологического происхождения. В биомассе растений находилось только 10–20% азота атмосферы. Этими опытами было установлено, что под влиянием инокуляции отдельными штаммами ассоциативных азотфиксаторов происходит лучшее усвоение азота удобрений, повышается коэффициент использования минерального азота [Сирэта, Васюк, 1985; Чеботарь, 1985].

Исследования, проводимые с двумя сортами риса и пшеницы на хорошо окультуренной дерново-подзолистой почве при использовании меченого азота удобрений, выявили, что ассоциативные азотфиксаторы могут способствовать лучшему усвоению азота из различных источников: мине-

ральных удобрений, почвы, атмосферы, но проявляется отмеченная способность только с определенными сортами растений, отзывчивыми на инокуляцию. Так, обработка семян риса сорта Дубовский 129 штаммами родоспирillы и флавобактерии способствовала повышению накопления азота в надземной массе растений в период кущения на 60–67% по сравнению с контролем. Рис сорта Солнечный оказался в этих условиях малоотзывчивым на инокуляцию. Как показало определение меченого и немеченого азота в вегетативной массе растений и зерне у риса сорта Дубовский в различные периоды онтогенеза, увеличение содержания общего азота происходило как за счет большого поступления азота удобрений, так и за счет азота почвы и атмосферы (табл. 3). Доля немеченого азота возрастила в период кущения и трубкования, особенно в корнях растений. По данным определения нитрогеназной активности *in situ*, наиболее высокая активность наблюдалась в вариантах с инокуляцией штаммом родоспирillы и составляла около 15–20% от общего азота растений.

Одним из эффективных приемов интенсификации процесса связывания азота атмосферы и тем самым повышения доли "биологического" азота в почве и урожае растений может явиться предпосевная обработка семян активными штаммами ассоциативных азотфиксаторов. К настоящему времени положительные результаты по инокуляции азоспирillами и другими diazotrofами получены в полевых опытах с кукурузой, морковью, сорго, просом, пшеницей, ячменем, рисом, кормовыми травами, новыми кормовыми культурами как в тропических и субтропических районах, так и в зоне умеренного климата [Boddey, Dobereiner, 1982; Берестецкий и др., 1985a; Dart, 1986].

В нашей стране испытание эффективности различных штаммов diazotrofov было приведено в южных и северо-западных районах европейской части СССР. Двухлетние опыты с инокуляцией штаммами азоспирill проса, риса, райграса пастицного показали положительные результаты [Малыцева, Волкогон, 1984; Ермолина, 1985]. В Ленинградской области совместно с сотрудниками Павловской опытной станции ВИРа было проведено испытание эффективности 16 штаммов diazotrofov, принадлежащих к различным систематическим группам, в 5 многолетних мелкоделяночных опытах с кормовыми травами: тимофеевкой луговой, двукисточником тростниковым и новой кормовой культурой — маральим корнем. Под влиянием инокуляции штаммами артробактера, акваспирillы, эрвии, флавобактерии, родоспирillы наблюдалось повышение урожая надземной массы на 12–28% и сбора сырого белка на 14–32%. Отмечена различная реакция растений на бактеризацию и избирательное отношение микроорганизмов к видам кормовых трав. Наиболее отзывчивыми оказались тимофеевка луговая и овсяница тростниковая, обработка семян двукисточника тростникового оказалась мало эффективной. У тимофеевки луговой под влиянием инокуляции значительно увеличилась зеленая масса растений, у овсяницы тростниковой заметно возросло процентное содержание сырого белка [Берестецкий и др., 1985a]. Штаммы артробактера и флавобактерии способствовали не только увеличению сбора сырого белка, но и повышали содержание такой важной аминокислоты, как лизин, в урожае тимофеевки луговой на 31 и 38% соответственно и на 10 и 28% у овсяницы тростниковой (данные З.В. Чмелевой). Бактеризация марального корня ак-

Таблица 3

Динамика использования азота рисом сорта Дубовский 129 под влиянием инокуляции ассоциативными азотфиксаторами

Штамм бактерий	Надземная масса		
	Кущение		Трубкование
	Накопление, мг/мг/сосуд	Прибавка, %	Накопление, мг/сосуд
<i>Азот удобрений (¹⁵N)</i>			
Контроль	10,9	—	13,8
Flavobacterium	17,6	61,5	15,3
Rhodospirillum	16,6	52,3	18,4
НСР _{0,95}	1,6		0,7
<i>Азот почвы и атмосферы (¹⁴N)</i>			
Контроль	19,7	—	24,8
Flavobacterium	33,8	71,2	34,7
Rhodospirillum	32,7	66,0	39,8
НСР _{0,95}	3,1		1,7

тивными штаммами корневых диазотрофов помимо повышения урожая на 12–18% способствовала увеличению содержания каротина и аскорбиновой кислоты в зеленой массе растений на 28 и 22% [Васюк, 1985б].

По результатам проведенных вегетационных опытов и полевых испытаний на основе трех штаммов эффективных ассоциативных азотфиксаторов, принадлежащих к родам *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Flavobacterium*, по инициативе О.А. Берестецкого были созданы бактериальные препараты. Двухлетнее испытание опытных партий этих препаратов на базе ВНИИСельхозмикробиологии с зерновыми культурами показало перспективность их применения и специфичность действия под различными сельскохозяйственными растениями. Опыты были поставлены на дерново-подзолистой среднеокультуренной почве с внесением минеральных удобрений из расчета N₆₀P₆₀K₆₀ и препаратов с титром бактерий 3–6 млн клеток на семя. Семена растений контрольных делянок обрабатывали автоклавированным препаратом. Препарат азоспириллы способствовал повышению урожая ячменя на 25,2%, овса – на 15,5%. Препарат артробактера повысил урожай пшеницы на 11,6%. Применение препаратов ассоциативных азотфиксаторов способствовало увеличению накопления азота в зерне пшеницы на 12,8% под влиянием артробактера, в зерне ячменя – на 39,7% под влиянием азоспириллы. Препарат флавобактерии был эффективен в опытах с кормовыми травами, повысив урожай овсяницы красной на 20,7%, лисохвоста лугового – на 22,2%.

К настоящему времени накоплено достаточно сведений о большой экологической и практической значимости процесса ассоциативной азотфиксации. Разработаны методы определения активности усвоения атмосферного азота. Обнаружены азотфикссирующие ассоциации бактерий различных систематических групп и различных видов как однодольных, так и двудольных растений. Можно высказать предположение о заметной роли этого вида

Грубкование	Надземная масса		Зерно	
	Созревание		Накопление, мг/сосуд	Прибавка, %
	Прибавка, %	Накопление, мг/сосуд		
<i>Азот удобрений (¹⁵N)</i>				
—	13,5	—	29,4	—
11,2	13,1	—3,1	30,1	2,4
33,3	12,4	—8,1	37,7	28,2
0,8			2,6	
<i>Азот почвы и атмосферы (¹⁴N)</i>				
—	23,4	—	38,9	—
39,9	27,0	15,4	41,2	6,0
60,5	19,2	—17,9	44,1	13,4
	2,9		4,2	

азотфиксации в азотном балансе почв. Для практического применения в сельскохозяйственном производстве предложен ряд бактериальных культур. Установлено избирательное отношение сортов и линий пшеницы, риса, видов кормовых трав к бактеризации различными видами ассоциативных азотфиксаторов.

Существует несколько мнений о механизме действия корневых диазотрофов. По литературным данным, известно, что ассоциативные азотфиксаторы помимо основной своей функции усваивать азот атмосферы могут продуцировать ауксины, гиббереллин, цитокинины и тем самым влиять на продуктивность растений. Под действием инокуляции в первый период развития растений усиливается поглотительная способность корней без увеличения их массы. Замечено улучшение минерального и водного обмена у инокулированных растений. Вместе с тем высказывается и другое объяснение эффекта действия диазотрофов – это защитная реакция самих растений на инокуляцию повышенной продукцией ростстимулирующих факторов [Окон, Карапник, 1986]. Нам кажется, что повышение содержания аскорбиновой кислоты и каротина, а также факт уменьшения массы корней – это защитная реакция растений на инокуляцию определенными видами ассоциативных азотфиксаторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Берестецкий О.А., Васюк Л.Ф. Азотфикссирующая активность в ризосфере и на корнях небобовых растений // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1983. № 1. С. 44–50.
 Берестецкий О.А., Васюк Л.Ф., Элиашвили Т.А. и др. Эффект инокуляции тимофеевки луговой и овсяницы тростниковой диазотрофами из природных азотфикссирующих ассоциаций злаков // С.-х. биология. 1985. № 3. С. 48–52.
 Берестецкий О.А., Васюк Л.Ф., Элиашвили Т.А., Плющ А.В. Азотфикссирующая активность и эффективность спирилл, обитающих на корнях растений // Микробиология. 1985. Т. 54, вып. 6. С. 1002–1007.

Васюк Л.Ф. Влияние доз минерального азота на эффективность ионокуляции небобовых растений ассоциативными азотфиксаторами // Тр. ВНИИСельхозмикробиологии. 1985а. Т. 55. С. 18–27.

Васюк Л.Ф. Ассоциативные азотфиксаторы и условия их эффективного применения // Бюл. ВНИИСельхозмикробиологии. 1985б. № 42. С. 16–19.

Васюк Л.Ф., Иванов Н.С. Роль ассоциативных азотфиксаторов в повышении продуктивности пшеницы // Микробиологические процессы в почвах и урожайность сельскохозяйственных культур. Вильнюс. 1986. С. 64–66.

Емцев В.Т., Ницэ Л.К., Покровский Н.П. Несимбиотическая азотфиксация и закономерности ее функционирования в почве // Минеральный и биологический азот в земледелии СССР. М.: Наука, 1985. С. 213–221.

Ермолина А.В. Азотфиксирующие бактерии ризосфера риса, возделываемого бессменно и в севообороте // Бюл. ВНИИСельхозмикробиологии. 1985. № 42. С. 34–37.

Калининская Т.А., Редькина Т.В. Микрофлора семян риса как источник азотфиксирующих микроорганизмов в его ризосфере // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1981. № 4. С. 617–621.

Мальцева Н.Н., Волкогон В.В. Азотфикссирующая бактерия *Azospirillum lipoferum* в почве, ризосфере и ризоплане сельскохозяйственных растений // Микробиол. журн. 1984. Т. 46, № 1. С. 6–9.

Мищустин Е.Н. Азотный баланс в почвах СССР // Минеральный и биологический азот в земледелии СССР. М.: Наука, 1985. С. 3–11.

Сирота Л.Б., Васюк Л.Ф. Влияние инокуляции риса корневыми диязотрофами на потребление и баланс азота на ранних стадиях развития растений // Бюл. ВНИИСельхозмикробиологии. 1985. № 42. С. 23–26.

Умаров М.М. Значение несимбиотической азотфиксации в балансе азота в почве // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1982. № 1. С. 92–105.

Хальчицкий А.Е., Турова Т.П. Изучение таксономического положения азотфиксирующих спирillum // Микробиология. 1986. Т. 55. вып. 2. С. 301–304.

Чеботарев В.К. Использование ассоциативных азотфикссирующих микроорганизмов для увеличения урожая сорго // Селекция и семеноводство сорго. Зерноград, 1985. С. 77–86.

Avivi Y., Feldman M. The response of wheat to bacteria of the genus *Azospirillum* // Isr. J. Bot. 1982. Vol. 31. P. 237–245.

Balandreau J. Microbiology of the association // Canad. J. Microbiol. 1983. Vol. 29. P. 851–859.

Baldani V.L.D., de Alvarez B., Baldani J.I., Dobereiner J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum // Plant and Soil. 1986. Vol. 90. P. 35–46.

Boddey R.M., Dobereiner J. Association of *Azospirillum* and other diazotrophs with tropical gramineae // Non-symbiotic Nitrogen Fixation and Org. Matter Trop. XII Intern. Congr. Soil Sci., New Delhi, 8–16. Febr. 1982. Symp. New Delhi, 1982. Pap. I. P. 28–47.

Dart P.J. Nitrogen fixation associated with non-legumes in agriculture // Plant and Soil. 1986. Vol. 90. P. 303–334.

Neyra C.A., Dobereiner J. Nitrogen Fixation in grasses // Adv. Agron. 1977. Vol. 29. P. 1–38.

Okon Y., Kapulnik Y. Development and function of *Azospirillum* inoculated root // Plant and Soil. 1986. Vol. 90. P. 3–16.

Patriquin D.G., Dobereiner J., Jain D.K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses // Can. J. Microbiol. 1983. Vol. 29. P. 900–915.

Venkataraman G.S. Non-symbiotic nitrogen fixation // Rev. Soil Res. India. XII Intern. Congr. Soil Sci. New Delhi, 8–16 Febr. 1982. Symp. New Delhi, 1982. Pap. I. P. 205–235.

Vose P.B. Developments in non-legume N_2 -fixing systems // Canad. J. Microbiol. 1983. Vol. 29. P. 837–850.

Watanabe J., Barraquio W.L. Low levels of fixed nitrogen required for isolation of free-living N_2 -fixing organisms from rice roots // Nature. 1979. Vol. 277. P. 565–566.

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ЗАТРАТЫ НА АССОЦИАТИВНУЮ АЗОТФИКСАЦИЮ И ИХ ОБЕСПЕЧЕНИЕ В РИЗОСФЕРЕ НЕБОВЫХ РАСТЕНИЙ

Л.В. Кравченко

Всесоюзный научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии, Ленинград

Микробиологическая фиксация молекулярного азота — один из наиболее энергоемких биологических процессов. Согласно только биохимическим расчетам, при восстановлении аэробными бактериями 1 моля азота необходимо затратить около 400 ккал, для чего требуется полностью окислить 0,55 молей глюкозы субстрата [Pate et al, 1981]. При этом энергетические затраты на процесс азотфиксации у ассоциативных бактерий в модельных опытах гораздо выше указанной теоретической величины. Еще более низка эффективность азотфиксации в природных условиях в ризосфере [Умаров и др., 1985].

Потребность в повышенном количестве энергии у ассоциативных азотфиксаторов связана со сложным характером энергетических затрат, определяющихся рядом индивидуальных процессов, происходящих при ферментативном восстановлении азота и их варьировании в зависимости от биологических условий. Количество образующейся энергии и эффективность ассоциативной азотфиксации зависит от субстрат-энергетической "стоимости" процессов, которые, в свою очередь, детерминируются генотипом и условиями жизнедеятельности фиксаторов.

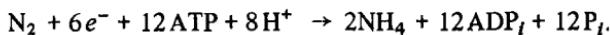
В почве в зоне корня происходят комплексные явления, связанные с поступлением дополнительного источника энергии и определяющие способность эффективного функционирования ассоциативных азотфиксаторов. При рассмотрении вопроса о поведении азотфиксаторов в ризосфере следует стараться учесть взаимосвязь всех конкурирующих процессов.

В настоящей статье рассматриваются процессы, оказывающие влияние на энергетические затраты при ассоциативной азотфиксации и на эффективность использования диазотрофами корневых экзометаболитов в ризосфере.

Для того, чтобы оценить реальные энергетические затраты на азотфиксацию и определить возможность их варьирования, необходима индивидуальная характеристика клеточных процессов, сопряженных с работой нитрогеназного комплекса. При этом из-за отсутствия прямых экспериментальных данных мы в большинстве случаев может воспользоваться только теоретическими оценками, полученными в модельных условиях [Gutschick, 1982; The energetics..., 1982].

Затраты субстрата на непосредственное функционирование нитрогеназного комплекса могут значительно меняться в зависимости от способа получения энергии прокариотной клеткой. По данным, установленным в модельных системах, при переносе активированного электрона на нитрогеназный комплекс гидролизуется как минимум 2 молекулы АТР

[Orme-Johnson et al., 1977]. Тогда ферментативная реакция восстановления молекулярного азота может быть представлена в следующей форме:



Для анаэробов в случае гомоферментативного брожения, когда акцептором электронов служат органические соединения – конечные продукты брожения, затраты субстрата, расходуемого на работу нитрогеназы, определяются эффективностью превращения субстрата в энергию и количеством образующихся молекул ATP. В зависимости от вида брожения при сбраживании 1 моля глюкозы образуется от 1 до 3 молей ATP. Поэтому для получения необходимых для проведения реакции 12 молей ATP требуется от 4 до 12 молей глюкозы на 1 моль фиксированного азота.

У аэробных гетеротрофов свободная энергия субстрата расходуется не только на образование ATP, но и на перенос пары электронов на молекулярный кислород. В то же время при использовании органического субстрата в прокариотных клетках полное окисление 1 молекулы глюкозы в оптимальном варианте приводит к образованию 38 молекул ATP, а на перенос пары электронов на молекулярный кислород расходуется 3 молекулы ATP. Так как для восстановления 1 молекулы азота требуется 3 пары активированных электронов, суммарные энергетические затраты в этом случае будут составлять 21 молекулу ATP, или 0,55 (21/38) молей глюкозы на моль фиксированного азота.

Варьирование энергетических затрат на работу нитрогеназы у аэробных ассоциативных фиксаторов связано с изменением эффективности окисительно-фосфорилирования, зависящего от генотипа организма и условий его роста (изменения фенотипа). При уменьшении показателя эффективности P/O с 3 до 1 энергетические затраты из-за снижения выхода ATP до 16 молей ATP на моль глюкозы возрастают в 2,4 раза, достигая величины 1,3 молей глюкозы на моль фиксированного азота.

Существенное изменение эффективности использования свободной энергии субстрата может происходить при смене видового состава азотфикссирующего комплекса, приводящей к изменению механизма восстановления молекулярного азота с аэробного на анаэробный. У анаэробов хотя и наблюдается более высокая экономичность расходования энергии, предназначенной для работы нитрогеназы, но на единицу метаболизированного субстрата у анаэробов, как видно из приведенных расчетов, фиксируется молекулярного азота в 3–20 раз меньше.

Микробиологическая фиксация азота сопровождается одновременным выделением молекулярного водорода. Нитрогеназа наряду с восстановлением молекул азота катализирует восстановление протонов воды. В то же время известно, что азотфикссирующие микроорганизмы содержат фермент гидрогеназу, который способен реутилизировать водород, выделяемый нитрогеназой [Кондратьева, Гоготов, 1981; Evans et al., 1981]. Изменение степени рециклизации водорода в азотфикссирующей клетке может служить источником дополнительного варьирования энергетических затрат при функционировании нитрогеназы. На величину отношения молярных количеств образуемых нитрогеназой водородных и восстановленных азотных молекул (H_2/N_2) существенное влияние оказывают температура, pH среды и соотношения между компонентами нитрогеназы: Mo-Fe-белком

и Фёбелком [Mortensen, Thorneley, 1979]. При ингибиовании гидрогеназы в клетках свободноживущих азотфиксаторов значение отношения H_2/N_2 не бывает меньше единицы. Оно может возрастать в ряде случаев более чем в 20 раз при низком парциальном давлении кислорода и лимитированности культуры азотфиксатора по углероду субстрата [Walker et al., 1981].

Процесс восстановления протонов с учетом энергетических затрат на перенос одной пары электронов на нитрогеназу [Orme-Johnson et al., 1977] сопровождается гидролизом 4 молекул АТР:



а для образования пары активированных электронов требуется от 1 до 3 молекул АТР. Таким образом, потеря энергии, связанная с выделением молекулярного водорода, будет составлять 5–7 молей АТР на каждый моль водорода. Когда скорость выделения водорода равна скорости восстановления азота, затраты субстрата, связанные с образованием водорода, изменяются в диапазоне 0,19–0,25 молей глюкозы на 1 моль фиксированного азота соответственно при уменьшении коэффициента Р/О с 3 до 2 [The energetick..., 1982].

Окисление 1 молекулы водорода при его реутилизации гидрогеназой приводит к образованию дополнительных 2 молекул АТР [Ruiz-Arqüeso et al., 1979]. От наличия и активности в бактериях гидрогеназы в значительной степени будет зависеть эффективность использования энергии в процессе азотфиксации.

У интенсивно фиксирующих и быстрорастущих клеток свободноживущих азотфиксаторов минимальные затраты на синтез нитрогеназы в аэробных условиях в случае использования только атмосферного азота не превышают 2,5 г глюкозы на 1 г белка фермента [Gutschick, 1982]. Указанная величина может возрасти в 2–2,6 раза при низкой эффективности окислительного фосфорилирования и учете расхода энергии на синтез клеточных структур (сопрягающих мембран и расположенных в них переносчиков электронов), участвующих в функционировании нитрогеназного комплекса. Затраты субстрата в таком случае будут представлять существенную величину – 0,3–0,6 г глюкозы на 1 г сухого веса клетки.

Для поддержания высокого уровня активности нитрогеназы в течение всего периода ее функционирования в клетке требуются затраты энергии на обновление молекул фермента и клеточных структур. Энергетические затраты на повторный синтез нитрогеназы составляют 4 молекулы АТР на одну пептидную связь, или 12000 молекул АТР для Mo-Fe- и Fe-белков [Gutschick, 1982]. Полученную величину также необходимо удвоить с целью учета обновления сопряженных с нитрогеназной структурой клетки.

Ассоциативные азотфиксаторы восстанавливают молекулярный азот в фазу активного роста, которая в модельных опытах обычно продолжается от нескольких часов до 1 сут [Upchurch, Mortenson, 1980; Haahtela et al., 1983]. Приняв среднее время интенсивной фиксации равным 10 ч, можно оценить величину энергии, необходимой для повторного синтеза белка, в $24 \cdot 10^3$ молей АТР на моль нитрогеназы за час. С учетом скорости ферментативной реакции, достигающей для свободноживущих бактерий родов *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Clostridium* $27 \cdot 10^3$ молей фиксирован-

ного азота на моль нитрогеназы в час [Upchurch, Mortenson, 1980], затраченная энергия в пересчете на количество восстановленного азота будет составлять 0,89 молей АТР на моль фиксированного азота, или в единицах потребленного субстрата: для аэробов – 0,023–0,56, а для анаэробов – 0,30–0,89 молей глюкозы на моль фиксированного азота.

При парциальном давлении кислорода, превышающем 0,2 атм, наблюдается репрессия синтеза нитрогеназы [Stewart, 1982]. В случае более высоких значений pO_2 в клетке для поддержания функционирования нитрогеназы существуют специальные механизмы защиты от кислорода в стадии экспоненциального роста. Скорость потребления кислорода у азотфиксаторов существенно выше, чем у других бактерий. Клетки азотбактера за 1 ч потребляют 4000–5000 мкл O_2 на 1 мг сухой массы, в то время как *Pseudomonas aeruginosa* только 194–197, *Escherichia coli* – 5–147, а *Brucella abortus* – 3–58 мкл O_2 на 1 мг сухой массы клеток в час [Мищустин, Шильникова, 1968]. Истощение концентрации кислорода достигается, если дыхание у азотфиксаторов возрастает до величины, превышающей скорость поступления растворенного кислорода в среду. Потребление субстрата бактериями в случае дыхательной защиты значительно выше, чем необходимо для покрытия потребностей роста. При этом процесс образования АТР в клетке может стать лимитирующим фактором в увеличении скорости дыхания и причиной уменьшения защищенности нитрогеназы от кислорода [Robson, Postgate, 1980].

Микроаэрофильным азотфиксаторам для защиты нитрогеназа от кислорода необходимо расходовать дополнительное количество энергии. Экспериментально показано, что при уровне азотфиксации 45 мг азота в 1 ч на 1 г сухой массы клеток затраты субстрата на повышение интенсивности дыхания определяются в 1 г маннита в 1 ч на 1 г сухого веса клеток, что соответствует в расчете на 1 г восстановленного азота затратам 22 г маннита. Полученная величина сравнима с суммарными потребностями азотфикссирующей клетки, составляющими в данном случае 28 г маннита на 1 г фиксированного азота [Dalton, Postgate, 1969]. Из приведенных данных видно, что затраты за защиту нитрогеназы от кислорода могут быть одними из самых больших при ассоциативной азотфиксации.

В модельных условиях в жидких культурах определены суммарные затраты субстрата на рост и азотфикссирующую активность бактерий. Производительность азотфиксации, как следует из опытов, наиболее высокая у микроаэрофильных бактерий и составляет для *Azospirillum lipoferum* 40–80 г малата на 1 г фиксированного азота [Okon, Albreeht, 1976]. У анаэробов производительность ниже, она не превышает для *Clostridium pasteurianum*, *C. acetylbutylicum* соответственно 120–280 и 200–385 г глюкозы на 1 г фиксированного азота [Mishustin, Emtsev, 1975].

Таким образом, затраты энергии на биосинтез белка, поддержание функционирования нитрогеназы, выделение молекулярного водорода и защиту фермента от кислорода в значительной мере определяют расход субстрата, идущего на обеспечение процесса азотфиксации в прокариотной клетке. На эффективность использования энергетического источника оказывают влияние видовой состав азотфикссирующего комплекса и изменение условий внешней среды.

Корневые экзометаболиты представляют собой основной субстрат, ис-

Таблица 1

Количество углерода корневых экзометаболитов в ризосфере злаковых растений

Растение	Длительность опыта	Количество углерода	Литературный источник
Пшеница	3 нед	18–25% от прироста углерода растения	Barber, Martin, 1976
Пшеница, ячмень	3 нед	33–40% от усвоенного при фотосинтезе углерода	Whipps, 1984
Пшеница	Полный вегетационный период	14–23% от общего углерода растения	Martin, 1977
Пшеница, кукуруза	Полный вегетационный период, 18 сут	33% от усвоенного при фотосинтезе углерода	Sauerbeck, Johnen, 1977; Helal, Sauerbeck, 1984

пользуемый для покрытия всех энергетических затрат ассоциативных азотфиксаторов в ризосфере [Умаров, 1982; Кравченко, 1985]. В их состав входят: водорастворимые органические вещества, выделяющиеся из растущих корней; летучие метаболиты, обладающие высокой реакционной и проникающей способностью в почве; высокомолекулярные полисахариды (муцигель), образующие слои на поверхности корней; отслаивающиеся клетки корневого чехлика, многие из которых остаются в корневой зоне; лизирующие клетки эпидермиса. Больше всего в растворимых корневых эксудатах содержится легко метаболизируемых микроорганизмами сахаров, органических кислот, аминокислот. Летучие метаболиты состоят в основном из этанола и ацетальдегида, которые служат источником энергии и углерода для ризосферных микроорганизмов. Муцигель корней, кроме воды, содержит главным образом улеводные полимеры, включая целлюлозу и пектиновые вещества [Берестецкий и др., 1978; Martin, 1977; Newman, 1978].

В табл. 1 приведен ряд данных, характеризующих размеры корневой эксудации, определенной с помощью использования меченой углекислоты, при различной длительности выращивания растений. Применение изотопной метки позволяет наиболее полно учитывать количество углерода во всех группах корневых экзометаболитов. Как видно из табл. 1, корни выделяют в почву значительную часть углерода, усвоенного при фотосинтезе. Изменение условий роста растений (длительности светового дня, температуры, структуры почвы), их сорта и возраста вызывает варьирование интенсивности образования экзогенного органического вещества в зоне корня. На основе обобщения экспериментальных данных [Newman, Watson, 1977] получено, что диапазон выделения экзометаболитов в период активного роста корня составляет за сутки от 6 до 250 мг на 1 г сухой массы корней. Наиболее вероятные количества корневых эксудатов за сутки в зоне умеренного климата равны 50–150 мг на 1 г сухого веса корней.

[Gardner et al., 1983]. В результате сезонного обновления корневой системы общее количество органического вещества корневой массы, доступного для потребления микроорганизмами ризосфера, значительно (в 3–4 раза) превышает содержание углерода, находящегося в корневых остатках, обнаруживаемых в почве после сбора урожая [Sauerbeck, Johnen, 1977].

Таким образом, интенсивное поступление в ризосферу продуктов фотосинтеза создает высокую энергетическую обеспеченность этой зоны. Приведенные величины корневых экзометаболитов позволяют сделать примерный расчет количества органического вещества, поступающего в процессе вегетации растения в почву. Допуская, что уровень углерода корневых экзометаболитов составляет 25% от общего углерода растения и учитывая массу одного растения пшеницы (5 г), а также плотность посева, равную 3–5 млн семян на 1 га, можно определить размер сезонной эксудации органического вещества, достигающей 6–10 т/га.

В случае, если бы все выделившиеся органические вещества потреблялись только азотфиксирующими бактериями, то, допуская, что на восстановление 1 г азота свободноживущими бактериями в среднем расходуется 60 г субстрата, получается, что за счет энергии корневых экзометаболитов под пшеницей за сезон должно фиксироваться 110–220 кг азота на 1 га. Несоответствие расчетной величины значениям сезонной продуктивности ассоциативной азотфиксации, определенной в полевых условиях и не превышающей 40–50 кг азота на 1 га [Умаров и др., 1985], подтверждает тот факт, что только часть энергетического материала используется на процесс ассоциативной азотфиксации.

Основная причина низкой эффективности азотфиксации в ризосфере небобовых растений связана с совпадением экологических ниш, занимаемых фиксирующими и нефиксирующими микроорганизмами. Ввиду повышенных энергетических потребностей ассоциативные азотфиксаторы обладают низкой конкурентной способностью по отношению к нефиксющим микроорганизмам, находящимся на одном с ними трофическом уровне. Пока не существует четких представлений о доле энергии корневых экзометаболитов, которая расходуется непосредственно на процесс биологической фиксации азота.

На рост и продуктивность азотфиксирующей популяции помимо поступления энергии оказывают влияние почвенные и агротехнические факторы. Величина ассоциативной азотфиксации в ризосфере находится в сложной зависимости от внешних условий, включающих в себя парциальное давление кислорода, количество минерального азота в почве, уровень влажности. Ассоциативные азотфиксаторы можно представить как почвенные диазотрофы, которые в процессе жизнедеятельности в зависимости от экологических условий меняют путь своего метаболизма – используют молекулярный азот воздуха или же минеральные формы азота почвы и удобрений [Döbereiner, 1983]. Значительное содержание минерального азота в почве стимулирует переход азотфиксаторов с метаболитического пути фиксации молекулярного азота воздуха на метаболитический путь использования имеющегося в почве минерального азота. Дефицит азота вынуждает азотфиксаторов возвращаться на первоначальный метаболитический путь. Процесс перехода микробных клеток из одного состояния в другое, с одной

Таблица 2

Влияние водорастворимых компонентов корневых экзометаболитов на нитрогеназную активность в колонках с почвой

Параметр	Сахароза	Малат	Сахароза + малат	Сахароза + малат		
	NH ₄ Cl			Глутамат	Аланин	Серин
Численность диазотрофов, млн кл/г почвы	28	123	144	35	236	269
Нитрогеназная активность, мкмоль C ₂ H ₄ /г почвы · сут	1,44	1,55	2,24	0,72	3,69	4,99

стороны, заключает в себе элементы случайного процесса, а с другой — обеспечивает стабильное соотношение между числом микроорганизмов с различными метаболитическими путями усвоения азота. Все многообразие почвенных микроорганизмов, не обладающих способностью к азотфиксации, можно представить как непосредственных конкурентов за органический субстрат, выделяемый корнями растений в почву [Берестецкий и др., 1986].

Рассмотрим некоторые причины варьирования эффективности использования энергетического субстрата почвенными диазотрофами. Известно, что практически все растения стимулируют развитие азотфикссирующих бактерий в ризосфере, однако изменение состава корневых экзометаболитов у разных видов может вызвать большие различия в активности азотфиксации. В модельных опытах методом проточно-непрерывного культивирования микроорганизмов в колонках с почвой нами изучалось влияние состава субстрата на эффективность его использования диазотрофами. Варианты опыта отличались источниками углерода, но его количество, подаваемое в колонки, было везде одинаково. В первых трех вариантах концентрация минерального азота в жидком субстрате равнялась 3,5 мг N на 1 л, а в трех остальных вариантах минеральный азот заменен на ту же концентрацию азота аминокислот (табл. 2). Длительность непрерывного культивирования почвенных образцов составляла 8 сут.

Как видно из результатов микробиологического анализа, количество диазотрофов значительно менялось в зависимости от состава субстрата. Максимальное число диазотрофов обнаружено в варианте с малатом и следами минерального азота. Очень плохо диазотрофы развивались при использовании сахарозы в качестве источника углерода. Замена в питательных растворах минерального азота на азот аминокислот вызывала изменение количества диазотрофов в почве.

Максимальная величина нитрогеназной активности в исследуемых вариантах наблюдалась в случае добавления серина. Наличие аланина в среде также вызывало усиление процесса азотфиксации. Несмотря на то, что количество пропускаемого через колонки с почвой легко метаболизируе-

Таблица 3

Влияние летучих соединений, входящих в состав корневых экзометаболитов, на рост и нитрогеназную активность *A. brasiliense*

Вариант	Штамм 7		Штамм 25	
	Численность, млн кл/мл	Нитрогеназная активность, мкмоль C_2H_4 / сут $\cdot 10^8$ кл.	Численность, млн кл/мл	Нитрогеназная активность, мкмоль C_2H_4 / сут $\cdot 10^8$ кл.
Малат (контроль)	218	70,5	188	91,1
Малат+этанол	319	13,7	373	31,1
Этанол	532	1,0	1020	1,9
Ацетальдегид	60	0,8	16	1,5

мого углерода субстрата было одинаковым, нитрогеназная активность отличалась по вариантам более чем в 5 раз. Полученные данные показывают, что эффективность использования энергии на процесс несимбиотической азотфиксации тесно связана со специфическим отношением диазотрофов к составу используемого субстрата.

Летучие органические корневые экзометаболиты могут влиять на характер азотного метаболизма почвенных диазотрофов. В табл. 3 приведены результаты замены малата, используемого в жидкой минеральной среде при росте двух штаммов *A. brasiliense*, на эквивалентное количество этанола и 25% расчетной дозы ацетальдегида. Этанол и ацетальдегид резко, 50–100 раз, ингибировали нитрогеназную активность азоспирилл. Причем добавление этанола к малату также вызвало понижение уровня азотфиксации исследуемых штаммов. В то же самое время летучие метаболиты, особенно этанол, являются хорошим субстратом для роста численности диазотрофов.

Эффективность использования ассоциативными азотфиксаторами энергетического субстрата корневых выделений в значительной мере зависит от характера взаимодействия микробных комплексов в ризосфере.

Для изучения взаимоотношения ассоциативных азотфиксаторов с нефиксирующими ризосферными бактериями проводили опыты в жидких культурах. В качестве объектов исследования были выбраны азотфиксирующие штаммы *A. brasiliense* – Sp. 7, Sp. 107, Sp. 137, *A. lipofерум* – Sp. 59B, Sp. D₁₁₋₈, а также ризосферные нефиксирующие бактерии *Pseudomonas* sp., *Ps. putida*, *Agrobacterium* sp. Культивирование микроорганизмов проводили на безазотистой среде с добавлением ацетилена для определения нитрогеназной активности.

В табл. 4 приведены результаты определения нитрогеназной активности смешанных культур диазотрофов с нефиксирующими ризосферными бактериями. В случае штамма Sp. 7 чистая культура обладала высокой активностью нитрогеназного комплекса, а добавление конкурирующей за источник питания ризосферной микрофлоры существенно снижало эту активность. Аналогичные результаты получали при культивировании штамма Sp. 107. Однако конкурентные взаимоотношения не исчерпывают все возможные взаимодействия ассоциативных азотфиксаторов с нефиксирующей

Таблица 4

Влияние совместного культивирования diazотрофов и нефиксировавших бактерий на интенсивность нитрогеназной активности

Диазотрофы	Ризосферные бактерии	Нитрогеназная активность, нм C_2H_4 мг/сут
Sp. 7	—	98,3
	<i>Ps. putida</i>	16,6
	<i>Pseudomonas</i> sp.	23,0
	<i>Agrobacterium</i> sp.	35,7
Sp. 107	—	34,7
	<i>Ps. putida</i>	11,7
	<i>Pseudomonas</i> sp.	11,1
	<i>Agrobacterium</i> sp.	11,8
Sp. D_{11-8}	—	42,4
	<i>Ps. putida</i>	25,3
	<i>Pseudomonas</i> sp.	28,4
	<i>Agrobacterium</i> sp.	42,4
Sp. 137	—	7,1
	<i>Ps. putida</i>	19,2
	<i>Pseudomonas</i> sp.	30,2
	<i>Agrobacterium</i> sp.	65,3

микрофлорой. При культивировании штамма $Sp.D_{11-8}$ с ризосферными бактериями *Agrobacterium* sp. не наблюдалась конкурентные взаимоотношения за источник питания. По-видимому, ризосферные бактерии лучше использовали продукты метаболизма азотфиксатора. Два других штамма *Ps. putida* и *Pseudomonas* sp. оставались конкурентами и для штамма $Sp.D_{11-8}$.

При совместном культивировании фиксирующих и нефиксировавших азот микроорганизмов может наблюдаться и стимулирование азотфиксации активности. При низкой интенсивности азотфиксации в чистом виде для штамма Sp. 137 в случае смешанных культур регистрируется значительное повышение активности. Особенно резкое увеличение, более чем в 9 раз, отмечено при культивировании со штаммом *Agrobacterium* sp.

Таким образом, корневые экзометаболиты, составляющие значительную часть фотосинтезируемого растения углерода, могут в достаточной степени обеспечить энергетические затраты на рост и продуктивность ассоциативных азотфиксаторов. Однако в зоне корня происходят сложные трофические взаимодействия фиксирующих микроорганизмов с нефиксировавшим комплексом, определяющие способность ассоциативных азотфиксаторов активно функционировать в ризосфере. Эффективность ассоциативной азотфиксации во многом обусловлена варьированием энергетических потребностей азотфиксаторов, локальным избытком энергии в ризосфере, благоприятными экологическими условиями и специфическим взаимодействием с растениями и окружающей микрофлорой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Берестецкий О.А., Кравченко Л.В., Фомичева А.П. Количественный анализ летучих выделений растений и микроорганизмов // Докл. ВАСХНИЛ. 1978. № 1. С. 17–19.

Берестецкий О.А., Швытов И.А., Кравченко Л.В. Имитационное моделирование ассоциативной азотфиксации в ризосфере небобовых культур // Там же: 1986. № 7. С. 6–7.

Кондратьева Е.Н., Гоготов И.Н. Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. М.: Наука, 1981. 342 с.

Кравченко Л.В. Влияние корневых выделений на рост и продуктивность ассоциативных азотфиксаторов // Бюл. ВНИИСельхозмикробиологии. 1985. № 42. С. 19–23.

Мищустин Е.Н., Шильникова В.К. Биологическая фиксация атмосферного азота. М.: Наука, 1968. 531 с.

Умаров М.М., Куракова Н.Г., Садыков Б.Ф. Азотфиксация в ассоциациях микроорганизмов с растениями // Минеральный и биологический азот в земледелии СССР. М.: Наука, 1985. С. 205–213.

Умаров М.М. Значение несимбиотической азотфиксации в балансе азота в почве // Изв. АН СССР, Сер. биол. 1982. № 1. С. 92–105.

Barber D.A., Martin J.K. The release of organic substances by cereal root into soil // New Phytol. 1976. Vol. 76, N 1. P. 69–80.

Dalton H., Postgate J.R. Growth and physiology of *Azotobacter chroococcum* in continuous culture // J. Gen. Microbiol. 1969. Vol. 56, N 2. P. 307–319.

Döbereiner J. Dinitrogen fixation in rhizosphere and phyllosphere associations // Inorganic Plant Nutrition. Berlin etc.: Springer Verlag, 1983. P. 330–350.

Evans H.J., Purohit K., Cantrell M.A. et al. Hydrogen losses and hydrogenases in nitrogen-fixing organisms // Current perspectives in nitrogen fixation in *Planta* Canberra. Australian Academy of Science. 1981. P. 84–96.

Gardner W.K., Barber D.A., Parbey D.G. Non-infecting rhizosphere microorganisms and the mineral nutrition cereal // J. Plant Nutr. 1983. Vol. 6, N 2. P. 185–199.

Gutschick V.P. Energetics of microbial fixation of dinitrogen // Microbes and Engineering Aspects. Berlin: Springer Verlag, 1982. P. 109–167.

Haahrtela K., Kari K., Sundman V. Nitrogenase activity of root-associated cold-climate *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, and *Pseudomonas* sp. during growth on various carbon sources and various pO_2 // Appl. and Environ. Microbiol. 1983. Vol. 45, N 2. P. 563–570.

Halal H.M., Sauerbeck D.R. Influence of plant roots on C and P metabolism in soil // Plant and Soil. 1984. Vol. 76, N 1/3. P. 175–182.

Martin J.K. Factor influencing the loss of organic carbon from wheat roots // Soil Biol. and Biochem. 1977. Vol. 9, N 1. p. 1–7.

Mishustin E.N., Emteev V.T. Anaerobic nitrogen-fixing bacteria of different soil types // Nitrogen fixation by free-living microorganisms. Cambridge: Univ. Press, 1975. P. 29–100.

Mortensen L.E., Thorneley R.N.F. Structure and function of nitrogenase // Annu. Rev. Biochem. 1979. Vol. 48. P. 387–418.

Newman E.I. Root microorganisms: their significance in the ecosystem // Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 1978. Vol. 53, N 4. P. 511–554.

Newman E.I., Watson A. Microbial abundance in the rhizosphere: a computer model // Plant and Soil. 1977. Vol. 48, N 1. P. 17–56.

Okon Y., Albreeht S.L., Burris R.H. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum* // J. Bacteriol. 1976. Vol. 125. P. 1248–1254.

Orme-Johnson W.H., Davis L.C., Henzl M.T. et al. Recent development in nitrogen fixation. L., 1977. P. 131–178.

Pate J.S., Atkins C.A., Rainbird R.M. Theoretical and experimental costing of nitrogen fixation and related processes in nodules of legumes // Current perspectives in nitrogen fixation in *Planta* Canberra. Australian Academy of Science. 1981. P. 105–116.

Robson R.L., Postgate J.R. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation // Annu. Rev. Microbiol. 1980. Vol. 34. P. 183–207.

Rulz-Argüeso T., Emerick D.W., Evans H.J. Characteristics of the H_2 oxidizing system in soybean nodule bacteroids // Arch. Microbiol. 1979. Vol. 121, N 2. P. 113–118, 121.

Sauerbeck D.R., Johnen B.G. Root formation and decomposition during plant growth // Soil organic matter studies. Viehna: Inst. Atomic Energy Agency. 1977. P. 144–147.

Stewart W.D.P. Nitrogen fixation – its current relevance and future potential // Isr. J. Bot. 1982. Vol. 31, N 1/4. P. 5–44.

The energetics of biological nitrogen fixation // *Publ. Amer. Soc. Plant Physiol.* 1982. N 1. P. 1–30.

Upchurch R.G., Mortenson L.E. In vivo energetics and control of nitrogen fixation: changes in the adenylate energy charge and ADP/ATP ratio of cells during growth on dinitrogen versus growth on ammonia // *J. Bacteriol.* 1980. Vol. 143, N 1. P. 274–284.

Walker C.C., Partridge C.D.P., Yates M.G. The effect of nutrient limitation on hydrogen production by nitrogenase in continuous cultures of *Azotobacter chroococcum* // *J. Gen. Microbiol.* 1981. Vol. 124, N 2. P. 317–327.

Whipps J.M. Environmental factors affecting the loss of carbon from the root of wheat and barley seedlings // *J. Exp. Bot.* 1984. Vol. 35, N 155. P. 767–773.

УДК 631.81:631 (470)

ОЦЕНКА РАЗМЕРОВ НЕСИМБИОТИЧЕСКОЙ АЗОТФИКСАЦИИ В РАЗЛИЧНЫХ ПОЧВАХ СССР

В.Н. Кудеяров

Институт почвоведения и фотосинтеза АН СССР, Пушкино

Несмотря на обширное число работ по балансу азота в земледелии как отдельных регионов, так и СССР в целом до сих пор остаются неясными очень важные составляющие этого баланса — поступление в почвы за счет несимбиотической азотфиксации и отчуждение вследствие денитрификации почвенного азота. Причина этого в отсутствии удовлетворительных методов определения размеров несимбиотической азотфиксации и денитрификации в естественных почвенных условиях, потому что существуют объективные трудности на пути определения размеров этих процессов.

Наиболее важные из них — это невозможность установления изменений содержания азота в данном объеме почвы с ошибкой меньше, чем величина самого изменения содержания общего азота в почве в определенный отрезок времени и сложность измерения потерь азота из этой системы за счет улетучивания газообразных продуктов азота. Тем не менее имеются попытки установления размеров азотфиксации балансовым методом в полевых условиях. Для этих целей некоторые исследователи используют данные многолетних стационарных опытов, в которых с определенной долей условности рассчитывается баланс азота. При этом положительные его значения относят за счет биологической азотфиксации.

Наиболее интересные данные по балансу азота получены сотрудниками Ротамстедской опытной станции (Великобритания) [Jenkinson, 1977, 1982; Powson et al., 1986]. Ими приводятся данные по балансу азота в классическом опыте с бессменной пшеницей, проводимом с 1843 г. Так, показано, что в варианте без внесения азота (PKMg) в течение 115 лет баланс азота складывался с положительным сальдо, в среднем +41 кг/га · год. В последующей работе, когда в опыте на варианте с внесением азотных удобрений была применена метка ^{15}N , авторам [Powson et al., 1986] удалось рассчитать поступление в почву азота из атмосферы за 1980–1983 гг. в среднем за год в размере 47,6 кг/га. Последняя цифра относится к варианту с ежегодным внесением азота 144 кг/га. Для варианта без внесения азота его поступление из атмосферы в 1980–1981 гг. составляя

Таблица 1

Возможные размеры несимбиотической азотфиксации в условиях многолетних стационарных опытов в различных почвенно-климатических зонах страны

Почва	Культура	Учреждение, литературный источник	Продолжительность наблюдения	Средний многолетний урожай основной культуры на варианте без N, ц/га	Возможный размер несимбиотической фиксации, кг/га · год
Дерново-подзолистая	Озимая рожь	ДАОС НИУИФ, [Хлыстовский и др., 1986]	50	21,4	30
Темно-серая	Конопля	ВНИИ Лубяных культур, [Городний, 1960]	30	18,6	40
Слабовыщелоченный чернозем	Озимая пшеница	Мироновская опытная, станция [Соболев, 1960]	35	20,7	38
	То же	Сумская областная опытная станция [Горшков, 1960]	15	20,5	36
Выщелоченный чернозем	Озимая рожь	Орловская оп. станция, [Щевелев, 1960]	40	23,0	32
Мощный чернозем	Озимая рожь	Харьковская областная опытная станция [Найдин, 1960]	37	19,9	34
	То же	Рамонская опытная станция, Воронежская область, [Тонкаль, 1960]	14	18,9	41
Осололедильный чернозем	Озимая рожь	Носовская опытная станция [Бойко, 1960]	31	16,1	40
Серозем	Хлопчатник	Ак-Кавакская опытная станция СОЮЗНИХИ, УзССР, [Белоусов, 1960]	30	15,3	39

ло 34,5–35,7 кг/га · год. Применение метки ^{15}N позволило авторам также рассчитать потери азота из почвы, которые составляли на N_0 – 9,2 и N_{144} – 53,6 кг/га · год. В районе Ротамстеда с осадками в среднем выпадает около 10 кг/га · год N в виде окислов азота и около 4 кг/га · год – в виде сухих аммонийных солей. Следовательно, биологическим путем в почвы Ротамстеда на делянки без внесения азотных удобрений за период 1980–1983 гг. поступило азота около 20 кг/га · год, а при внесении азотных удобрений – около 30 кг/га · год.

Используя аналогичный метод баланса, Е.Н. Мишустин и Н.И. Черепков [1979] показали, что в черноземы Украины за счет несимбиотической азотфиксации может поступать 23–55 кг/га · год. В стационарном опыте на дерново-подзолистой почве И.С. Шатилов и др. [1977] установили положительный баланс азота в размере 37 кг/га · год, который отнесли за счет несимбиотической азотфиксации.

Нами рассчитан баланс азота на основании опубликованных материалов многолетних полевых опытов, проводимых Долгопрудной агрохимической опытной станцией НИУИФ, ВНИИ лубяных культур, Орловской (Шатиловской), Мироновской, Носовской, Сумской станции, СоюзНИХИ и др. опытных учреждений. В расчетах использованы данные урожаев основной и побочной продукции, содержание азота в почве. В некоторых опытах были приведены данные по содержанию общего азота в почвах на момент закладки опыта и по прошествии определенного периода времени, что давало возможность наиболее полного расчета баланса азота. В работах, в которых не были приведены данные по содержанию азота в урожае, таковые рассчитывались на основе справочных материалов. Использовалось следующее уравнение баланса:

$$\text{N}_2 - \text{N}_1 = \Phi + \text{O} + \text{C} + \text{У} - \text{B}, \text{ или } \Phi = \text{N}_2 - \text{N}_1 + \text{B} - \text{У} - \text{O} - \text{C},$$

где N_2 и N_1 – содержание общего азота в почве ко времени T_2 и T_1 соответственно; Φ – количество азота, фиксированного из воздуха; O , У , C – поступление азота с атмосферными осадками, с удобрениями, и с семенами соответственно; B – вынос азота с урожаем. Данное уравнение, разумеется, не полностью отражает все составляющие баланса азота в системе почва–растение–удобрение–атмосфера. К сожалению, не представляется возможным в опытах учесть расход азота на денитрификацию и вымывание.

Признавая определенную условность расчетов баланса по приведенному уравнению, тем не менее полученные данные позволяют судить о порядке величин возможной фиксации азота несимбиотическим путем в условиях рассматриваемых стационарных опытов (табл. 1). Обращает на себя внимание тот факт, что вычисленные размеры несимбиотической азотфиксации очень близки между собой для различных почвенно-климатических зон и составляют 30–40 кг/га · год. Достаточно близки и средние многолетние урожаи зерна озимых культур на вариантах без внесения азотных удобрений. Такое совпадение не случайно, поскольку уровень актуального плодородия длительно обрабатываемых и не удобряемых азотом почв поддерживается исключительно за счет прихода связанного азота из атмосферы. Это подтверждается и тем, что временные изменения содержания общего азота в почвах обсуждаемых опытов весьма значительны и практически не достоверны. Следовательно, в устоявшейся системе почва–растение

Таблица 2

Возможные величины несимбиотической азотфиксации в опытах с озимой пшеницей на различных почвах (кг/га · год)

Почва	Число опытов	Урожай зерна, ц/га	Нетто-минерализация ^{*1}	Вынос с урожаем ^{*2}
Дерново-подзолистые ^{*7}	109	21,7	191	57
суглинистые	52	25,7	215	67
супеси и пески	57	19,3	158	51
Серые лесные ^{*7}	8	22,5	246	59
Черноземы ^{*8}				
выщелоченные и оподзоленные типичные	33	30,5	200	98
обыкновенные	13	28,3	180	91
	6	25,8	200	83

*1 Вычислено по нашей методике [Кудеяров, 1983].

*2 Рассчитано по данным урожаев с использованием имеющихся нормативов [Химизация сельского хозяйства, 1977].

*3 Относительный размер потерь почвенного азота взят 20% от величины нетто-минерализации N почвы.

*4 Фактически внесенное количество азота удобрений в опытах; потери определены в размере 20% от внесенной дозы.

вынос азота с урожаем культур численно равен количеству азота, поступившему в почву из атмосферы. Если сравнить вычисленные нами данные с данными Е.Н. Мищустина и Н.И. Черепкова [1979], а также с данными И.С. Шатилова и др. [1977], то видно, что они достаточно близки и составляют в среднем 30–40 кг N/га · год.

Такого же порядка величины несимбиотической азотфиксации получены в Ротамстеде [Powlson et al., 1986]. Здесь следует еще раз заметить, что данные английских авторов получены на основе тщательного анализа азотного баланса в многолетнем опыте. Как отмечают они сами, опыт с бессменной пшеницей в Ротамстеде представляет собой уникальную возможность для исследования азотного баланса в системе почва–растение. Весьма интересный факт, что содержание азота в пахотном слое почвы на всех вариантах опыта поддерживается на одном уровне начиная с 1881 г., т.е. приход и расход азота находится в динамическом равновесии. Это говорит о том, что ежегодное количество минерализуемого азота из органического вещества почвы равно количеству, иммобилизованному в органическое вещество. В результате авторам удалось с использованием метки ¹⁵N существенно уточнить баланс азота в системе почва–растение, определив кроме легко устанавливаемых составляющих прихода (N удобрений, N осадков, выноса N с урожаем) еще и такие, как ежегодную нетто-минерализацию азота в почве. Последние два показателя позволяют определить потери почвенного азота вследствие улетучивания, что, в свою очередь, делает систему замкнутой и помогает вычленить приход в почву азота за счет несимбиотической фиксации.

В условиях неизменяющегося во времени содержания общего азота в почвах, когда поддерживается динамическое равновесие между приходом и расходом азота в системе почва–растение (такие условия создаются

Газообразные потери азота почвы ^{*3}	Азот удобрений ^{*4}		Азот в семенах ^{*5}	Азот атмосферных осадков ^{*6}	Несимбиотическая фиксация
	внесено	потери			
38	60	12	4	6	37
43	60	12	4	6	52
32	60	12	4	6	25
49	60	12	4	6	50
40	60	12	4	6	80
36	60	12	4	6	69
40	60	12	4	6	65

*5 Из расчета 200 кг/га семян.

*6 Взято из работы [Кудеяров и др., 1984].

*7 Данные урожаев взяты из работы В.Г. Минеева и М.М. Ивлева [1975].

*8 Данные урожаев взяты из работы Н.Н. Михайлова и В.Е. Явтушенко [1973].

в длительно культивируемых или целинных почвах), величина нетто-минерализации азота может служить той отправной точкой, которая позволяет учесть расход азота вследствие денитрификации. А если удается определить расход азота на денитрификацию, тогда оказываются определенными основные составляющие баланса и по разности вычисления прихода азота в почву из атмосферы. Используя данный подход, нами предпринята попытка рассчитать размеры несимбиотической азотфиксации для отдельных почвенно-климатических зон страны. Расчеты выполнены на основе данных Географической сети опытов с удобрениями ВИУА. Ранее [Кудеяров, 1983] были установлены размеры нетто-минерализации азота в почвах что позволило рассчитать и количество азота, подвергающегося денитрификации. Относительный размер денитрификации почвенного минерального азота принят таким же, как и для азота удобрений.

Для расчетов взяты усредненные относительные величины потерь азота за счет денитрификации, опубликованные в работе Д.А. Коренькова и Н.И. Борисовой [1980], а также нами [Кудеяров, 1985]. Уравнение баланса, использованное для расчетов величины несимбиотической азотфиксации, имеет следующий вид:

$$\Phi = B + D - Y - O - C,$$

где Φ – несимбиотическая азотфиксация, кг/га; B – вынос азота с урожаем сельскохозяйственных культур с учетом основной и побочной продукции, кг/га; D – потери азота удобрений и почвы вследствие денитрификации, кг/га; Y – азот, внесенный с удобрениями, кг/га; O – азот атмосферных осадков, кг/га; C – азот в семенах, кг/га.

Сделано допущение, что содержание общего азота в почвах остается неизменным в исследуемый период времени. В табл. 2 представлены дан. 8. Зак. 995

ные, характеризующие возможные величины несимбиотической азотфиксации в опытах с озимой пшеницей, проведенных на различных почвах. Расчетные величины несимбиотической азотфиксации оказались несколько выше таковых, определенных в стационарных опытах (табл. 1). При этом следует учесть, что в табл. 1 представлены данные без учета потерь азота на денитрификацию.

Полученные величины по несимбиотической азотфиксации (табл. 2), на первый взгляд, могут показаться достаточными, чтобы отказаться от применения азотных удобрений или вносить их в гораздо меньших дозах. Однако анализ этих данных показывает, что за вегетационный сезон с учетом реальной скорости минерализации микробиального азота растениями может усвоиться не более 20–30% несимбиотически связанного азота. Так, при сопоставлении данных по нетто-минерализации азота и выносу его с урожаем видно, что относительные размеры усвоения растениями минерального азота не превышали 50%. Следовательно, и после минерализации несимбиотически связанного азота растения также смогут взять не более 50%.

В свою очередь, минерализации подвергается не весь фиксированный азот, а только часть его, что в итоге дает небольшую величину усвоения этого азота. Например, максимальная величина несимбиотической азотфиксации, 80 кг/га, получена нами для выщелоченных и оподзоленных черноземов. Допустим, что за вегетационный сезон минерализации подвергалась половина этого азота, т.е. ~ 40 кг/га. Использование озимой пшеницей минерализованного азота составило $\sim 50\%$, тогда растениям могло достаться только ~ 20 кг/га несимбиотического азота, или $\sim 20\%$ от общего выноса этого элемента с урожаем. Остальные 80% азота, необходимого для формирования урожая зерна озимой пшеницы в 30,5 ц/га, были взяты из удобрений и почвенного органического вещества. Для других почв с более низкими величинами несимбиотической фиксации азота значение его в формировании урожая, очевидно, еще ниже.

Таким образом, установление количественных показателей азотного баланса в почве, заключающегося в определении нетто-минерализации азота, выноса этого элемента с урожаем растений, а также расходов на денитрификацию, позволяет с определенной точностью рассчитать и количество азота, поступающего в почвы вследствие несимбиотической азотфиксации. Возможные количества несимбиотически связанного азота, определенные в опытах с озимой пшеницей, составляют от 37 кг/га · год на дерново-подзолистых почвах до 80 кг/га · год на черноземах. Серые лесные почвы занимают промежуточное положение. Полученные данные свидетельствуют о наличии зональной зависимости в размерах несимбиотической азотфиксации. Интенсивность азотфиксации в почвах нарастает с повышением содержания в них органического вещества и при продвижении с севера на юг. Такая же закономерность наблюдается и в величинах нетто-минерализации азота. Отсюда очевидна связь между общим уровнем плодородия почв и способностью почв к несимбиотической азотфиксации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Белоусов М.А. Влияние длительного применения органических и минеральных удобрений на производительную способность орошаемых сероземов // Влияние длительного применения удобрений на плодородие почвы и продуктивность севооборотов. М., 1960. С. 366–383.

Бойко Е.И. Влияние длительного применения навоза и минеральных удобрений на урожай сельскохозяйственных культур и плодородие осоложенных почв // Там же. 1960. С. 251–261.

Городний Н.Г. Влияние длительного применения удобрений на агрономические свойства почвы и урожай культур конопляного севооборота // Влияние длительного применения удобрений на плодородие почвы и продуктивность севооборотов. М., 1960. С. 86–125.

Горшков П.А. Результаты опытов по изучению системы удобрения свекловичного севооборота на слабовыцелоченном черноземе // Там же. 1960. С. 262–321.

Кореньков Д.А., Борисова Н.И. Успехи и перспективы использования стабильных изотопов в агрохимии // Вестн. с.-х. науки. 1980. № 9. С. 22–27.

Кудеяров В.Н. Баланс минерализуемого азота почвы при выращивании сельскохозяйственных культур // Повышение плодородия почв и продуктивность сельскохозяйства при интенсивной химизации. М.: Наука, 1983. С. 23–35.

Кудеяров В.Н. Превращение в почвах азота удобрений и пути повышения его эффективности: Авторсф. дис. . . д-ра биол. наук. М., 1985. 32 с.

Кудеяров В.Н., Башкин В.Н., Кудеярова А.Ю., Бочкирев А.Н. Экологические проблемы применения удобрений. М.: Наука, 1984. 214 с.

Минеев В.Г., Ивлев М.М. Географические закономерности действия удобрений на урожай озимых хлебов // Географические закономерности действия удобрений. М.: Колос, 1975. С. 3–57.

Михайлов Н.Н., Явтушенко В.Е. Современное состояние плодородия черноземов Европейской части СССР // Агрохимические исследования почв и эффективность удобрений. М.: ЦИНАО, 1973. Вып. 1. С. 33–46.

Мищустин Е.Н., Черепков Н.И. Роль бобовых и свободноживущих азотфикссирующих микроорганизмов в азотном балансе земледелия // Круговорот и баланс азота в системе почва–удобрение–растение–вода. М.: Наука, 1979. С. 9–18.

Найдин П.Г. Результаты систематического внесения удобрений в севооборотах стационарных опытов Харьковской и Киевской областных опытных станций // Влияние длительного применения удобрений на плодородие почвы и продуктивность севооборотов. М., 1960. С. 220–250.

Соболев Ф.С. Действие навоза и минеральных удобрений в свекловичном севообороте на черноземной почве // Там же. 1960. С. 203–219.

Тонкаль Е.А. Навоз и дозы минеральных удобрений в системе удобрения культур свекловичного севооборота // Там же. 1960. С. 336–353.

Химизация сельского хозяйства. М.: НИИТЭХИМ, 1977. Вып. 8. 182 с.

Хлыстовский А.Д., Касицкий Ю.И., Корниенко Е.Ф., Калинина В.М. Продуктивность севооборота, баланс питательных веществ и плодородие дерново-подзолистой тяжело-суглинистой почвы при длительном применении удобрения // Тр. НИУИФ. 1986. Вып. 250. С. 167–187.

Шатилов И.С., Замараев А.С., Чаповская Г.В. Баланс азота в севообороте на дерново-подзолистой почве // Изв. ТСХА. 1977. Вып. 1. С. 34–45.

Шевелев М.П. Обогащение почвы навозом и фосфатами в зерновом севообороте на выщелоченном черноземе // Влияние длительного применения удобрений на плодородие почвы и продуктивность севооборотов. М., 1960. С. 144–168.

Jenkinson D.S. The nitrogen economy of the Broadbalk experiments. I. Nitrogen balance in the experiments // Rothamsted experimental station: Harpenden. Rep. for 1976. 1977. Pt 2. P. 103–109.

Jenkinson D.S. The nitrogen cycle in long-time field experiments // Phil. Trans. Roy. Soc. London. B. 1982. Vol. 296. P. 563–571.

Powlson D.S., Pruden G., Johnston A.E., Jenkinson D.S. The nitrogen cycle in the broadbalk wheat experiment: recovery and losses of ^{15}N -labelled fertilizer applied in spring and inputs of nitrogen from the atmosphere // J. Agr. Sci. Cambridge. 1986. Vol. 107. P. 591–602.

АЗОТФИКСАЦИЯ И ДЕНИТРИФИКАЦИЯ В АГРОЭКОСИСТЕМАХ НА СЕРЫХ ЛЕСНЫХ ПОЧВАХ

М.М. Умаров, О.Е. Коновалова, В.П. Шабаев

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Одна из важных проблем почвенной микробиологии – увеличение доли "биологического" азота в питании небобовых растений и повышение коэффициента использования азотных удобрений. Решение этой проблемы возможно различными путями [Умаров, 1986; Trolldenier, 1986], в частности, путем оптимизации доз азотных удобрений с учетом свойств почв и биологических особенностей растений. Установлено, что высокие дозы (75–300 мг N/кг) вызывают резкое снижение активности азотфиксации и возрастание денитрификации в почве [Степанов, 1985]. Однако дозы азота, не превышающие физиологических потребностей растений, ведут к увеличению поступления атмосферного азота в растения [Чистякова, Калининская, 1984; Умаров et al., 1985; Ladha et al., 1986].

Целью настоящей работы в связи с этим было изучение особенностей процессов азотфиксации и денитрификации в агрозоэкосистемах в зоне серых лесных почв при внесении различных доз азотных удобрений и применении различных приемов обработки почвы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на посевах озимой пшеницы и ячменя на многолетнем полевом опыте Института почвоведения и фотосинтеза АН СССР (г. Пущино) в различных вариантах.

1. Дозы внесения азотного удобрения (NH_4NO_3): C_1 – абсолютный контроль; C_2 – $60\text{P}_{60}\text{K}_{40}$; C_3 – $120\text{P}_{60}\text{K}_{120}$ под озимую пшеницу и $80\text{P}_{60}\text{K}_{60}$ под ячмень; C_4 – вариант C_3 с внесением навоза под предшествующую культуру.

2. Способы обработки почвы: A_1 – отвальная вспашка; A_2 – поверхностная обработка фрезой; A_3 – сочетание безотвального рыхления и поверхностной обработки.

Каждый из вариантов опыта был представлен на поле трижды с целью учета пространственной дисперсии изучаемых процессов.

Образцы для определения потенциальной активности азотфиксации и денитрификации отбирали с каждой делянки, актуальной (полевой) азотфиксацию определяли на вариантах C_1 , C_2 , C_4 в фазах цветения и колошения растений.

Актуальную азотфиксирующую активность измеряли также в течение вегетационного периода при выращивании растений райграса в условиях песчаных культур в оранжерее на питательной смеси Гельригеля при относительной влажности воздуха 60%, температуре воздуха 18–21°, освещенности 8000–10000 лк в период с 8.00 до 20.00 ч. Растения поливали деминерализованной водой, азот вносили в виде меченого ^{15}N азотно-кислого кальция. Опыт включал следующие варианты: *a*) контроль (без

внесения связанных азота); б) 1 доза азота с добавлением 0,2 г свежей почвы в качестве "затравки"; в) 1 доза азота с добавлением инокулума *Azospirillum* sp.; г) 1 доза азота с добавлением 0,25 г навоза; д) 3 дозы азота с добавлением 0,2 г свежей почвы.

Определение актуальной (полевой) и потенциальной активности азотфиксации почв проводили ацетиленовым методом в модификации, разработанной на кафедре биологии почв МГУ.

Определение потенциальной активности денитрификации проводили по изменению содержания закиси азота в почвенном воздухе [Куракова, Умаров, 1983].

Количественный учет бактерий в почве проводили люминесцентно-микроскопическим методом [Методы почвенной микробиологии и биохимии. 1980].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Данные по полевой (актуальной) активности азотфиксации представлены в табл. 1. Максимальная активность была обнаружена в варианте $C_4 A_3$ ($5,62 \pm 1,86$ мг N_2/m^2), минимальная – в варианте $C_1 A_1$ ($0,52 \pm 0,03$ мг N_2/m^2) под пшеницей. В большинстве случаев не удалось обнаружить достоверного увеличения азотфикссирующей активности в вариантах с совместным внесением высоких доз удобрений и навоза, и только в нескольких случаях наблюдалось повышение азотфиксации в варианте C_4 . Актуальная азотфикссирующая активность под ячменем была выше, чем под пшеницей.

Потенциальная активность азотфиксации и денитрификации в одном из вариантов показана на рис. 1, в остальных вариантах опыта получены аналогичные закономерности. Как видно из рис. 1, повышение дозы азота вызвало снижение азотфикссирующей активности. Соответственно газо-

Таблица 1

Актуальная азотфикссирующая активность в серой лесной почве, мг N_2/m^2

Растение, фазы развития	$C_1 A_2$	$C_4 A_3$	$C_1 A_3$
Пшеница			
колошение	$2,02 \pm 0,97$	$1,09 \pm 0,42$	$0,49 \pm 0,06$
цветение	Не опр.	Не опр.	$0,95 \pm 0,20$
Ячмень			
колошение	$2,98 \pm 0,62$	$4,72 \pm 0,17$	$1,41 \pm 0,27$
цветение	$1,00 \pm 0,19$	$0,51 \pm 0,11$	$3,39 \pm 0,93$
Растение, фазы развития	$C_4 A_3$	$C_1 A_1$	$C_4 A_4$
Пшеница			
колошение	$5,62 \pm 1,86$	$0,52 \pm 0,03$	$1,88 \pm 0,20$
цветение	$1,36 \pm 0,13$	$3,31 \pm 0,23$	Не опр.
Ячмень			
колошение	$0,94 \pm 0,10$	$4,76 \pm 0,46$	$1,59 \pm 0,25$
цветение	$0,94 \pm 0,22$	$1,51 \pm 0,51$	$1,00 \pm 0,19$
			$1,08 \pm 0,15$

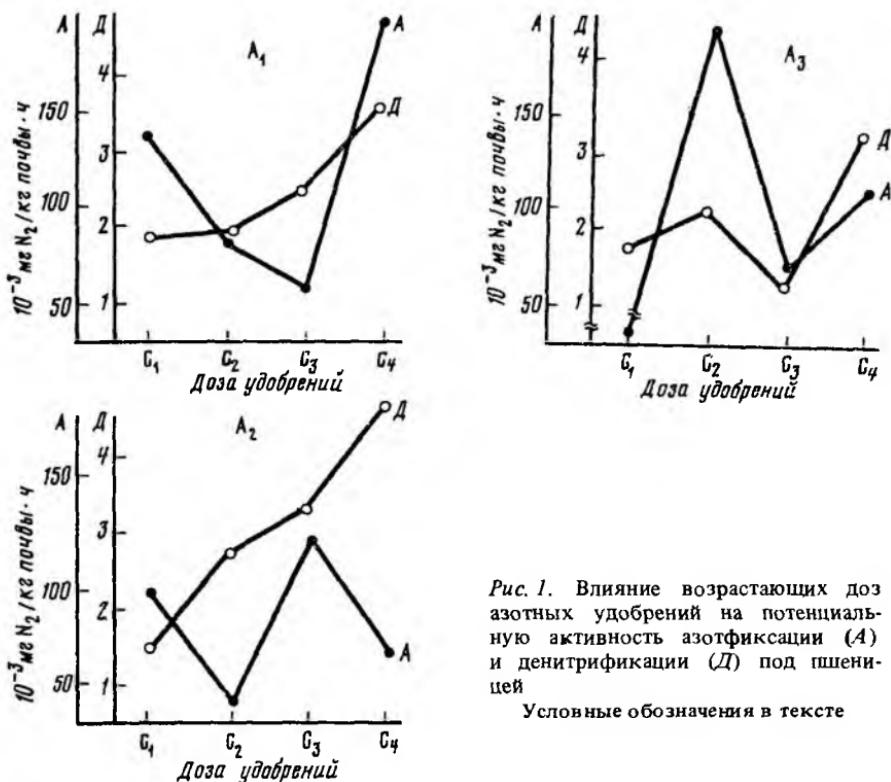


Рис. 1. Влияние возрастающих доз азотных удобрений на потенциальную активность азотфиксации (A) и денитрификации (D) под пшеницей

Условные обозначения в тексте

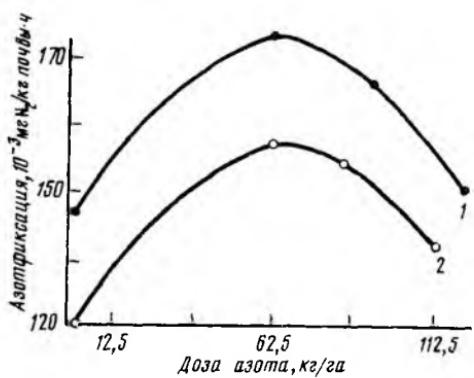


Рис. 2. Зависимость потенциальной активности азотфиксации от доз азотных удобрений для ячменя (1) и пшеницы (2)

образные потери азота из почвы (денитрификация) возрастили. Совместное применение минерального азота и навоза (вариант С₄) также вызывало резкое повышение активности денитрификации. Статистическая обработка полученных данных на ЕС-1055 с использованием стандартной программы из пакета BMDP позволила рассчитать коэффициенты уравнения регрессии и построить соответствующие графики изменения активности азотфиксации в различных вариантах опыта (рис. 2). Точки перегиба на кривых соответствуют дозе азота 60 кг/га.

Таблица 2

Коэффициенты вариации значений потенциальной активности азотфиксации и денитрификации, %

Вариант опыта	Азотфиксация		Денитрификация	
	Колошение	Цветение	Колошение	Цветение
<i>Пшеница</i>				
C ₁	89,9	17,3	35,6	74,9
C ₂	81,7	9,2	45,3	80,6
C ₃	86,6	34,3	47,8	70,7
C ₄	70,9	13,2	43,5	56,0
<i>Ячмень</i>				
C ₁	78,9	20,6	46,2	29,3
C ₂	55,9	39,0	69,3	48,0
C ₃	69,9	34,8	37,3	64,1
C ₄	47,0	26,0	65,7	69,0

Таблица 3

Статистические данные для значений азотфикссирующей и денитрифицирующей активности

Вариант опыта	Среднее квадратическое отклонение	Ошибка среднего арифметического	Критерий Стьюдента при уровнях вероятности		Предел доверительного интервала при уровнях вероятности	
			0,95	0,99	0,95	0,99
Актуальная азотфикссирующая активность						
полевой опыт	1,88	0,22	4,3	9,9	0,95	2,20
вегетационный опыт	5,68	1,04	2,3	3,2	2,39	3,33
Потенциальная азотфикссирующая активность	7,90	0,70	3,2	5,8	22,40	40,60
Денитрификация	1,24	0,10	3,2	5,8	0,32	0,58

Одной из задач нашего исследования была оценка пространственной неоднородности (вариабельности) показателей азотфиксации и денитрификации. Как известно, неоднородность — одно из главных отличий почвы от других природных сред. В агроэкосистемах неоднородность нередко усугубляется тем, что внесение удобрений производится неравномерно и заданная доза выдерживается весьма примерно. Одним из наиболее простых способов оценки неоднородности является расчет коэффициентов вариации (табл. 2), а также достоверности различий полученных данных (табл. 3).

Исходя из того, что коэффициенты вариации, а также доверительный интервал для полученных значений активности азотфиксации велики, оценка полученных данных может быть произведена только приблизительно: максимум азотфиксации соответствует дозе азота 60 + 30 кг/га

Таблица 4

Урожай зерна озимой пшеницы и ячменя в полевом опыте, ц/га

Вариант опыта	Озимая пшеница			Ячмень		
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₁	A ₂	A ₃
C ₁	19,3	13,6	14,2	16,9	15,5	15,7
C ₂	31,4	23,9	26,5	33,7	35,4	31,7
C ₃	35,7	31,9	31,9	36,8	35,8	33,7
C ₄	35,7	30,5	31,6	39,2	37,7	34,3

Таблица 5

Численность бактерий и удельная активность азотфиксации в серой лесной почве

Вариант опыта	Пшеница					
	A ₁		A ₂		A ₃	
	Б	АФ	Б	АФ	Б	АФ
C ₁	4,05	33,07	2,30	59,16	4,05	30,11
C ₂	4,61	31,77	6,23	23,59	4,60	37,11
C ₃	3,16	52,61	3,22	35,17	4,39	33,78
C ₄	5,75	23,91	5,75	25,55	3,94	36,72

Вариант опыта	Ячмень					
	A ₁		A ₂		A ₃	
	Б	АФ	Б	АФ	Б	АФ
C ₁	4,60	28,50	2,93	49,08	2,21	55,71
C ₂	7,31	27,66	2,61	73,34	5,27	22,82
C ₃	7,54	16,75	4,73	35,78	4,03	47,16
C ₄	5,12	32,47	5,36	31,08	7,47	17,20

Примечание. Б – численность бактерий $\times 10^9$ клеток в 1 г почвы; АФ – удельная активность азотфиксации, $\times 10^{-3}$ мг азота на 10^9 клеток.

(167×10^{-3} мг N_2 /кг почвы · ч для пшеницы и 165×10^{-3} мг N_2 /кг почвы · ч для ячменя). Следовательно, внесение доз азотных удобрений, превышающих указанные величины, не представляется целесообразным не только с точки зрения оптимизации соотношения "биологического" и минерально-го азота в урожае, но и с точки зрения урожайности выращиваемых культур. Это подтверждается данными по урожайности изученных культур, представленными в табл. 4. Как видно из таблицы, внесение высоких доз азота не приводит к соответствующему увеличению урожайности – она возрастает лишь на 5–10% при удвоении дозы азота.

Способы обработки почвы также могут оказывать влияние на процессы азотфиксации и денитрификации в результате изменения порозности, влажности почвы и обусловленной этим аэрации. Согласно полученным нами

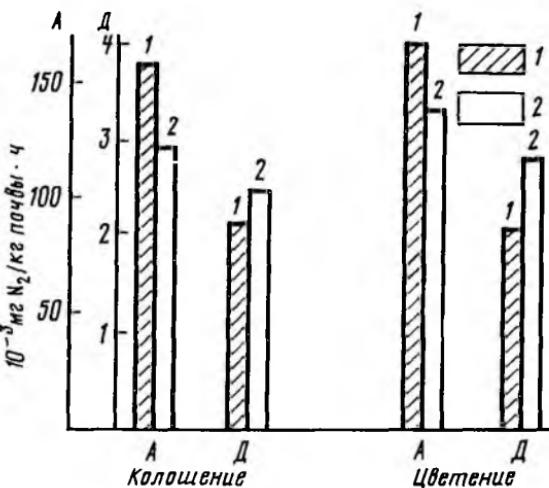


Рис. 3. Влияние вида растения на потенциальную активность азотфиксации (A) и денитрификации (D)

1 – ячмень; 2 – пшеница

данным, применение отвальной вспашки вызывает некоторое увеличение азотфикссирующей активности и снижение потерь азота почвой. Для минимальной обработки почвы получена противоположная зависимость. Данные по урожайности культур подтверждают преимущества обычной вспашки (табл. 4).

Известно, что одним из главных факторов, стимулирующих деятельность микробов-азотфиксаторов, является растение, причем разные виды растений в различной степени влияют на азотфиксацию в почве [Ladha et al., 1986]. Из полученных нами данных следует, что ячмень в большей степени, нежели пшеница, стимулируют активность азотфиксации, а потери азота почвой под ячменем на 20–30% ниже, чем под пшеницей (рис. 3). Для выяснения причин таких различий была определена нами численность бактерий во всех вариантах опыта, что позволило вычислить удельную активность азотфиксации (табл. 5). Прямой подсчет клеток в люминесцентном микроскопе не выявил значительных различий в численности бактерий по вариантам опыта. Следовательно, различия в уровне азотфиксации по вариантам данного опыта обусловлены скорее различиями в активности бактерий, чем их численности.

Согласно полученным данным, наиболее оптимальные условия для азотфиксации как под пшеницей, так и под ячменем, создаются при внесении доз азота, не превышающих 60 ± 30 кг/га, и при применении отвальной вспашки. Эти условия способствуют также и минимальным потерям азота почвой.

Поступление азота атмосферы (^{14}N) на фоне различных доз азотного удобрения [$\text{Ca}^{(15)}\text{NO}_3)_2$] было оценено при выращивании растений райграса (рис. 4). Активность азотфиксации по мере развития растений изменилась аналогично во всех вариантах опыта: максимум азотфиксации наблюдался в фазу цветения растений, в фазах проростков и кущения

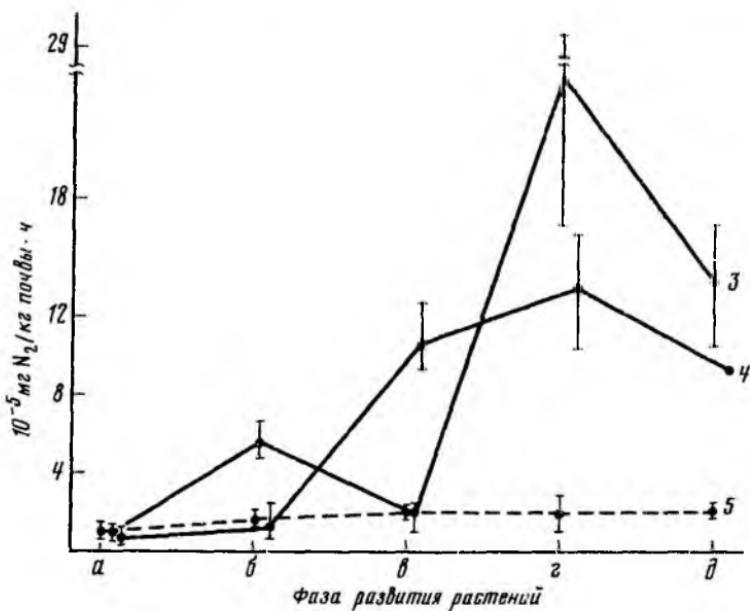
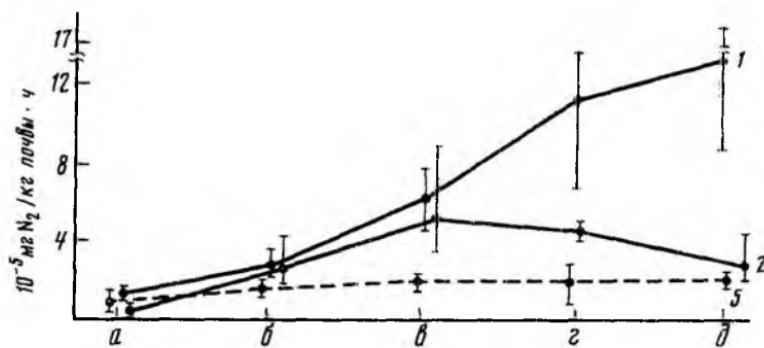


Рис. 4. Динамика азотфикссирующей активности при выращивании райграса
 1 - 1N + почв-инокулом; 2 - 1N + *Azospirillum* sp.; 3 - 1N + навоз; 4 - 3N + почв-инокулом; 5 - контроль; фазы развития растений: а - проростки; б - кущение; в - колошение; г - цветение; д - созревание

значения азотфикссирующей активности были минимальны для всех вариантов опыта и достоверно не различались между собой. Необходимо отметить, что азотфикссирующая активность при внесении почвы-инокулума (рис. 4, а, г) в фазе созревания не отличалась достоверно от максимальных ее значений в фазе цветения в отличие от других вариантов опыта, где она несколько уменьшалась.

Максимальные величины азотфикссирующей активности (23.03×10^{-5} мг азота/кг почвы · ч) были обнаружены в варианте с внесением навоза. Этот вариант характеризовался и наибольшей величиной поступления азота атмосферы (^{14}N) в растения (табл. 6). Эти данные согласуются с резуль-

Таблица 6

Баланс ^{14}N в растениях после уборки райгруса, мг/сосуд

Вариант опыта	Баланс ^{14}N
Контроль	+3.8
1 доза ^{15}N + почва-инокулюм	+11.7
1 доза ^{15}N + <i>Azospirillum</i> sp.	+11.7
1 доза ^{15}N + навоз	+15.5
3 дозы ^{15}N + почва-инокулюм	+9.3

татами, полученными другими исследователями, которые показали, что внесение органического вещества может стимулировать процесс азотфиксации [Ladha et al., 1986].

Увеличения азотфикссирующей активности при внесении культуры *Azospirillum* sp. не наблюдалось, максимальные значения в этом варианте не превышали 6×10^{-5} мг азота/кг почвы · ч, что соответствовало контрольному варианту. В варианте с тремя дозами азота + почва-инокулюм величины азотфикссирующей активности не отличались достоверно от значений, которые наблюдались в варианте с 1 дозой азота ^{15}N + почва-инокулюм.

Таким образом, на активность азотфиксации и денитрификации, а также на размеры поступления азота атмосферы в растения самым активным образом влияют минеральные азотные удобрения, оптимизация доз которых с учетом свойств почвы и биологических особенностей растений может повысить поступление "биологического" азота в почву и в растения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Куракова Н.Г., Умаров М.М. А.С. № 1117529. Способ определения потенциальной активности денитрификации почвы. Б.И., 1984, № 37.

Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1980. 224 с.

Степанов А.Л. Ассоциативная азотфиксация и денитрификация в дерново-подзолистой почве при внесении минеральных удобрений: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1985. 21 с.

Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация. М.: Изд-во МГУ, 1986. 136 с.

Чистякова И.К., Калининская Т.А. Фиксация азота в такыровидных почвах под рисом // Микробиология. 1984. Т. 53, вып. 1. С. 123–128.

Ladha J.K., Agnes C. Tirol, Gloria Calbo, Watanabe I. Rice-plant-associated N_2 fixation as affected by genotype, inorganic N fertilizer and organic manure // Trans. XIII Corngr. ISSS. Hamburg, 1986. Vol. 11. P. 598–599.

Trolldenier G. Nitrogen fixation in the rhizosphere of rice as affected by water regime and plant nutrition // Ibid. 1986. P. 648–649.

Umarov M., Shabaev V., Smolin V., Aseeva O. Incorporation of "biological" nitrogen by nonleguminous plants during associative N_2 fixation // IX Intern. Symp. on Soil Biol. Soil Biol. and Conservation of the Biosphere: Abstr. Pap. Sopron, 1985. P. 65.

ОБ АССОЦИАТИВНОМ СИМБИОЗЕ CLOSTRIDIUM С ВЫСШИМИ РАСТЕНИЯМИ

В. Т. Емцев, М.И. Чумаков, М.Х. Брук

Московская сельскохозяйственная академия им. К.А. Тимирязева

Ранее свободноживущим азотфикссирующим бактериям не придавалось большого значения в обеспечении почвы и растений азотом. Однако применение в последние годы высокочувствительных и точных методов регистрации активности азотфиксации в почве, таких, как изотопный и ацетиленовый [Hardy et al., 1968; Rennie R., Rennie D., 1983; Чумаков, Емцев, 1985], позволило пересмотреть наши взгляды на величину несимбиотической азотфиксации и роль бактерий-азотфиксаторов в снабжении растений азотом. Опубликованы работы, показывающие возможность управления со стороны растения активностью ассоциации злак-азотфикссирующие бактерии [Fujii et al., 1978; Rennie, Larson, 1979; Емцев и др., 1984].

Во многих странах усиленно разрабатывается концепция ассоциативной азотфиксации ("ассоциативного симбиоза", "диазотрофного биоценоза"). Показан значительный вклад ассоциативных азотфиксаторов в азотное питание растений. Определен круг известных на сегодняшний день бактерий-ассоциантов. Традиционно анаэробные азотфикссирующие бактерии рода *Clostridium* рассматривались как свободноживущая группа азотфиксаторов [Емцев, 1974; Емцев и др., 1984], но в последнее время появились работы, указывающие на более тесную связь этих бактерий с некоторыми высшими растениями (например, с рисом) [Fujii et al., 1978; Hirota et al., 1978].

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В полевых опытах сезона 1983–1984 гг. изучали яровую пшеницу сорта Ершовская-34. Растения выращивали на полях Ершовской опытной станции орошаемого земледелия (Саратовской области) в режиме орошения без применения азотных удобрений, на делянках размером 12×30 м в 3-кратной повторности опытов. Фосфорные и калийные удобрения в дозе Р60К40 кг/га вносили перед посевом. Отбор и обработку проб проводили по методу Д.Г. Звягинцева [1980]. Активность азотфиксации в почве и в прикорневой зоне пшеницы определяли ацетиленовым методом при помощи модифицированного нами устройства [Чумаков, Емцев, 1985]. Содержание NH_4^+ , NO_3^- в почве определяли ионометрически.

При проведении вегетационных опытов яровую пшеницу Саратовская-29, Альбидум-43, Саратовская-52, WS 1616 выращивали в модифицированных нами сосудах, предложенных В.В. Волкогоном [1984]. Почву брали темно-каштановую из-под пшеницы 3-го года возделывания, горизонт 0–20 см, вес образца почвы в сосуде 1 кг. Применяли также смесь: почва: песок в соотношении 1:1. Растения выращивались до полной спелости при продолжительности дня 16 ч и освещенности 17 тыс. лк. Влажность поддерживали на уровне капиллярной, подпитку водой вели снизу сосуда. Активность азотфиксации определяли ацетиленовым методом при помощи уст-

ройства, предложенного В.В. Волкогоном [1984] в небольшой модификации — диффузия ацетилена в почве происходила не пассивно, а применялось активное прокачивание через слой почвы газовой смеси (99% азота: 1% C_2H_2 или 99% воздуха: 1% C_2H_2) перистальтическим насосом. Повторность опытов 15-кратная. По мере роста пшеницы отбирали по 3 пробы на микробиологический анализ.

В микровегетационных опытах яровую пшеницу сортов Саратовская 29, Альбидум-43, WS 1616 выращивали до стадии 3 листьев и определяли нитрогеназную активность почвы в модифицированных нами устройствах [Чумаков, Емцев, 1985] по методу, предложенному Шер с соавт. [Scher, Ziegler, Kloeppe, 1984]. Объем сосудов 70–80 мл, навеска почвы 10–16 г, песка — 20 г.

Микробиологический анализ почвы, ризосфера и ризопланы пшеницы проводили в соответствии с принципами, предложенными в работах [Thomas-Bauzon et al., 1982; Scher et al., 1984]. Зоной ризосферы считали почву, оставшуюся на корнях в виде муфточки (1–2 мм) после встряхивания. Корни с прилипшей землей перед посевом обрабатывали на микроизмельчителе тканей при 5 тыс. об/мин в течение 5 мин для десорбции микроорганизмов с поверхности частичек почвы и корней.

В микровегетационных и вегетационных опытах исследовали микробиологическую популяцию ризопланы корней. Ризосферную почву удаляли, размачивая корни с ризосферной почвой в воде. Затем в колбах с физиологическим раствором (по 100 мл) проводили двухкратную мягкую отмывку корней ручным встряхиванием в течение 5 мин. Следующей операцией была двухкратная обработка корней при помощи микроизмельчителя тканей РТ-2 при 5 тыс. об/мин в течение 5 мин в 100 мл физиологического раствора (жесткая отмывка).

Корни, обработанные таким образом, делились на четыре части. Одну часть корней растирали в стерильной ступке и делали микробиологический анализ, вторую часть корней стерилизовали с поверхности (см. ниже), отмывали в физиологическом растворе двухкратно в колбах, растирали стерильно в фарфоровой ступке и производили микробиологический анализ. Третью и четвертую часть корней не растирали. Нестерилезованные и стерилизованные корни проверяли на обрастание на элективных средах, помещая корни на твердую среду Эшби, оптимально-дифференциальную среду Емцева [1965] и среду, предложенную Т.А. Калининской с соавт. [1981].

Количественный учет сахаролитических бактерий рода *Clostridium* осуществляли на полужидкой оптимально-дифференциальной среде Емцева [1965] методом предельных разведений в двух параллельных рядах пробирок. Повторность трехкратная. Пересчет вели по таблицам Мак-Креди. Количественный учет аэробных форм азотфиксаторов вели на полужидкой среде, предложенной Т.А. Калининской с соавт. [1981] в пробирках Хангейта, и среде Эшби в чашках Петри. Выделение накопительных и чистых культур бактерий производили из 3–5 разведений, давших положительную активность ацетиленредукции при количественном учете.

Азотфиксирующую активность накопительных и чистых культур при количественном учете определяли ацетиленовым методом [Hardy et al., 1968; Калининская и др., 1981] на средах, предложенных для анаэробных

и аэробных форм азотфикссирующих бактерий [Емцев, 1965; Калининская и др., 1981].

Поверхностную стерилизацию корней проводили NaOCl в концентрации 0,25–10%, раствор получали согласно методике, предложенной в работе И.Г. Скрипаля с соавт. [1984], а также $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 1–10%. После стерилизации корни дважды обильно отмывали стерильной дистиллированной водой или физиологическим раствором.

Стерильные семена пшеницы получали, обрабатывая зерновки по методу, предложенному в работе [Thomas-Bauzon et al., 1982]. Стерильные растения выращивали в сосудах объемом 90 мл на вермикулите, пропитанном смесью Гельригеля без азота. Заражение растений и определение ацетилен-редукции у них проводили в сосудах на стадии двух листьев [Чумаков, Емцев, 1985]. Культуру *Clostridium* для заражения выращивали на твердой среде Емцева [1965] в чашках Петри в микроанаэробатах под вакуумом. Инокулят готовили на физиологическом растворе сразу же после разгерметизации микроанаэробата. Инокулировали 3–4-суточной культурой в концентрации $1 \cdot 10^8$ клеток на растение.

Результаты опытов обрабатывали статистически.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Степень приуроченности *Clostridium* к корням высшего растения (яровой пшеницы)

Многие исследователи считают, что бактерии рода *Clostridium* могут поселяться на корнях пшеницы и фиксировать азот в тесной связи с растением. Для подтверждения этих данных мы провели учет численности *Clostridium* на корнях яровой пшеницы, используя последовательно мягкую отмыжку корней (встряхивание руками), жесткую отмыжку (при помощи микроизмельчителя тканей – РТ-2) и поверхностную стерилизацию корней. Проведенный нами количественный учет показал, что клетки *Clostridium* прочно удерживаются поверхностью корней пшеницы. После мягких отмыжек корней клетки в отмыжочном растворе не обнаружены (табл. 1). После десорбции бактерий с поверхности корней с помощью РТ-2 в отмыжочном растворе обнаруживалось значительное количество *Clostridium* 24000–26 500 000 клеток на 1 г корней. Это свидетельствует о наличии довольно прочной связи клеток *Clostridium* с поверхностью растительной ткани, природа которой пока неизвестна. Даже после двухкратной десорбции с помощью РТ-2 на корнях остается 0,2–1628 тыс./г корня клеток *Clostridium*.

Ранее [Годова, 1983] установлено, что *Clostridium* могут развиваться на поверхности корней злаков и в глубоких складках корня. Интересно было выяснить, обладают ли *Clostridium* способностью проникать в ткани корня. Для решения этой проблемы мы решили использовать метод химической поверхностной стерилизации корней $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 4%-ным раствором в течение 15–20 мин.

Было обнаружено, что *Clostridium* высеваются из гомогената корней после стерилизации (табл. 1). Количество зависело от сорта и возраста растения. Анализ сортов яровой пшеницы Саратовская-52, Альбидум-43, WS 1616 показал, что в зоне корня у сортов отечественной селекции заре-

Таблица 1

Численность сахаролитических *Clostridium* на корнях яровой пшеницы при различном режиме обработки (тыс. кл/г корня)

Сорт пшеницы	Мягкая обработка		Обработка на РТ-2		Гомогенизация корней без химической стерилизации	Гомогенизация корней с химической стерилизацией
	I	II	I	II		
Саратовская-52	—	0	26500	3600	4,6	2,1
Альбидум-43	—	—	30	1400	1628	0
WS1616	—	0	—	24	0,2	0

фиксировано больше сахаролитических *Clostridium*, чем у сорта зарубежной селекции. Разница в числе клеток наблюдалась как на стерилизованных, так и нестерилизованных корнях. Повторное заражение стерильного растения пшеницы (сорт Саратовская-52) штаммом *Clostridium*, который был выделен из корней этого сорта, показало, что *Clostridium* повторно колонизует корни пшеницы. После жесткой обработки корней зараженного растения в отмывочной воде были обнаружены клетки *Clostridium*.

Поверхностная стерилизация корней повторно зараженного растения пшеницы показала, что обработанные корни содержат клетки *Clostridium*. Это свидетельствует о том, что колонизация корней анаэробными азотфиксаторами происходит как на поверхности, так и внутри корней. Проверка выделенных после поверхностной стерилизации штаммов *Clostridium* на способность к фиксации азота в чистой культуре показала, что все они обладают нитрогеназной активностью.

Все изложенное выше дает основание рассматривать сахаролитические азотфиксирующие бактерии рода *Clostridium* в качестве микросимбионта яровой пшеницы. В то же время необходимо отметить, что ассоциация между яровой пшеницей и сахаролитическими *Clostridium* не является единственной в силу того, что, анализируя ризоплану яровой пшеницы, как уже описано выше, мы выделили еще несколько типов неидентифицированных азотфиксирующих бактерий.

В последующих исследованиях мы поставили перед собой задачу определить, насколько велика численность *Clostridium* в ризосфере и ризоплане яровой пшеницы, насколько она зависит от фаз развития растения, имеется ли корреляция численности *Clostridium* с динамикой азотфиксации в корневой зоне, а также с динамикой накопления биомассы и азота в надземной части яровой пшеницы.

Численность азотфиксаторов в почве и ризосфере растений

Результаты проведенных исследований в полевых условиях показали, что численность сахаролитических *Clostridium* в почве, окружающей корни, и на их поверхности зависит от фазы развития пшеницы. Максимум численности анаэробных бактерий приходится на период интенсивного вегетативного роста растений, вплоть до цветения (табл. 2). Причиной такого яв-

Таблица 2

Динамика численности *Clostridium* в ризосфере и ризоплане яровой пшеницы Ершовская-32 (полевой опыт 1983–1984 гг.)

Дата отбора проб на анализ	Фаза развития пшеницы	Ризосфера, (в тыс. кл./г почвы)	Ризоплана (тыс.кл/г почвы)
4.05	2 листа	13	—
17.05	3 листа	$13,6 \pm 10,5$	$3,3 \pm 1,8$
25.05	Кущение	1700 ± 2710	—
—	—	—	—
1.06	Выход в трубку	1660 ± 1440	—
1.06	трубку	40700 ± 16200	19300 ± 23700
16.06	Колошение	4400 ± 3200	—
15.06		$14 \pm 11,5$	$0,2 \pm 0,1$
29.06	Цветение	2310 ± 720	—
21.06		1840 ± 2000	1110 ± 1500
14.08	Молочная спелость	332 ± 645	—
—	спелость	—	—
27.07	Восковая спелость	104 ± 114	—
12.07	спелость	$2,7 \pm 2,0$	1250 ± 110
—	Полная спелость	—	—
26.07	спелость	52 ± 57	123 ± 110

Примечание. Числитель – данные 1983 г.; знаменатель – данные 1984 г.

Таблица 3

Динамика актуальной азотфиксации (ацетиленредукции) в зоне корней яровой пшеницы Ершовская-32 (полевой опыт 1983 г.)

Дата отбора проб на анализ	Фаза развития пшеницы	Активность азотфиксации (ацетиленредукции), $\text{Н} \mu\text{C}_2\text{H}_4/\text{г почвы/ч}$
4.05.	2 листа	$0 \overline{0}$
1.06	Выход в трубку	$18,0 \pm 4,0 \overline{—}$
16.05	Колошение	$15,6 \pm 4,8 \overline{13,9 \pm 5,3}$
29.06	Цветение	$1960,5 \pm 2018,9 \overline{152,3 \pm 18,1}$
7.07	Созревание	$0 \overline{0}$
14.07	Молочная спелость	$0 \overline{0}$

Примечание. Числитель – ризосфера + ризоплана; знаменатель – почва.

ления, видимо, служат корневые выделения растений, динамика количества которых носит аналогичный характер [Умаров, 1982, 1983]. В эксудатах пшеницы преобладают легкодоступные для микроорганизмов моносахара и аминокислоты [Берестецкий, 1982]. Общее количество корневых выделений может достигать 1/3 конечной вегетативной массы растений [Умаров, 1982, 1983] и обеспечивать энергетические затраты при азотфиксации.

Как видно из табл. 2 и 3, уровни численности азотфикссирующих *Clostridium* и активности несимбиотической азотфиксации в непосредственной близости от корней пшеницы в определенной мере совпадают. Этот факт позволяет предположить, что имеется определенная зависимость ассоциативной азотфиксации у пшеницы от численности анаэробных азотфиксаторов в зоне корней.

Следовательно, популяция сахаролитических *Clostridium* в корневой зоне яровой пшеницы развивается и функционирует в соответствии с фазами развития растения. Количественное значение вклада этой группы бактерий в азотное питание растений предстоит еще выяснить.

Накопление биомассы и азота яровой пшеницы и динамика нитрогеназной активности в почве, ризосфере и ризоплане растения

Проведенные наблюдения за активностью фиксации азота в зоне корней пшеницы показали, что она зависит от возраста растения и достигает максимума в период цветения (табл. 3). В этот период нитрогеназная активность микроорганизмов ризосферы возрастает на две порядка, по сравнению с активностью в фазы выхода в трубку и колошения. Аналогичную картину в ризосфере высших растений в период интенсивного роста наблюдали также другие авторы [Емцев и др., 1984; Умаров, 1983].

В связи с изложенным вполне закономерен вопрос о микроорганизмах, ответственных за ассоциативную фиксацию азота на корнях злаков. Различными авторами [Умаров, 1983; Fujii et al., 1978; Vose, 1983] показано, что эту функцию может осуществлять широкий круг представителей почвенной микрофлоры: *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Clostribium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*. Состав ассоциантов определяется многими факторами, в первую очередь растением-хозяином, типом почвы и целым рядом других экологических факторов. Поскольку для каштановых, темно-каштановых почв под пшеницей характерно преобладание среди азотфикссирующих бактерий *Clostridium* [Калининская и др., 1982, Rice, 1967], мы уделили им основное внимание.

Безусловно интересно было выяснить, в какой зависимости находятся численность сахаролитических *Clostridium*, нитрогеназная активность почвы и такие результирующие показатели, как количество гидролизуемого азота в почве и динамика накопления сухой биомассы и азота растениями.

В полевом опыте (сезон 1984 г.) приращение сухой биомассы в надземной части было максимальным в период выхода в трубку до цветения, динамика накопления азота пшеницей носит аналогичный характер (табл. 4). Прирост азота в эти же фазы развития пшеницы максимальен [Котляр, 1984]. Между тем определение количества легкодоступного азота в почве показало, что в этот период его количество в почве крайне мало.

Таблица 4

Динамика накопления биомассы и азота яровой пшеницы сорта Ершовская-32 (полевой сезон 1984 г.)

Дата анализа	Фаза развития растения	Проанализировано растений шт.	Масса 1 растения, г	Общее содержание азота в 1 растении, г
17.05.85	3 листа	10	0,06	0,002
1.06.85	Выход в трубку	10	0,93	0,022
15.06.85	Колосшение	10	1,18	0,020
21.06.85	Цветение	10	1,90	0,027
12.07.85	Восковая спелость	12	1,53	0,019
26.07.85	Полная спелость	54	1,76	0,025

В середине вегетации, на стадиях интенсивного роста и накопления азота количество нитратного и аммонийного азота в почве резко снижается. Яровая пшеница в нашем опыте при орошении и без применения азотных удобрений сформировала урожай зерна $34,5 \pm 2,5$ ц/га. Кроме того, необходимо учитывать, что при орошении наблюдается интенсивная денитрификация в почве и часть имеющегося азота не достигает растения. Возникает некоторый парадокс – пшеница накапливает значительное количество биомассы и азота в надземной части в условиях крайне низкого содержания азота в почве. Видимо, растение должно обладать механизмом, позволяющим накапливать азот в условиях азотного голода на стадиях интенсивного роста. Одним из механизмов, возможно, служит ассоциативная азотфиксация бактерий на корнях растений. Вполне возможно, что в ходе искусственной селекции пшеницы на урожайность и другие хозяйствственно-полезные признаки осуществлялся неконтролируемый отбор по признаку ассоциативной азотфиксации, восполняющей дефицит азота в растении. [Hirota et al., 1978; Родынюк, 1985]. Показана возможность воздействовать на активность ассоциативной азотфиксации у пшеницы при помощи манипуляции с дисомной хромосомой [Rennie, Larson, 1979].

Если сопоставить полученные нами результаты по динамике численности *Clostridium* и активности азотфиксации (ацетиленредукции) в ризосфере и ризоплане яровой пшеницы с динамикой накопления биомассы, то можно наблюдать определенную зависимость между этими показателями. Это позволяет говорить о том, что частично потребность пшеницы в азоте на этапах интенсивного накопления азота удовлетворяется за счет ассоциативной азотфиксации популяций бактерий, поселяющихся на корнях пшеницы, одним из активных членов ее являются сахаролитические *Clostridium*.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлены ассоциативные взаимоотношения ряда штаммов сахаролитических анаэробов рода *Clostridium* с яровой пшеницей. Значимость *Clostridium* как ассоциативных азотфиксаторов подтверждается данными по количественному учету сахаролитических анаэробов в почве, ризосфере и ризоплане яровой пшеницы, активностью азотфиксации (ацетиленредукции) в прикорневой зоне и динамикой накопления биомассы и общего азота яровой пшеницы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Берестецкий О.А. Роль культурных растений в формировании микробных сообществ почвы: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1982. 48 с.

Волкогон В.В. Способ определения активности азотфиксации в почве // Микробиол. журн. 1984. Т. 46, № 2. С. 89–91.

Годова Г.В. Ассоциации анаэробных бактерий рода *Clostridium* в корневой зоне растений и их азотфикссирующая активность: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1983. 22 с.

Емцев В.Т. Методы количественного учета различных видов маслянокислых и ацетонобутиловых бактерий в почве // Докл. ТСХА. 1965. Вып. 109. С. 123–130.

Емцев В.Т. Почвенные анаэробные азотфиксаторы рода *Clostridium* // Успехи микробиологии. М.: Наука, 1974. Вып. 9. С. 153–182.

Емцев В.Т., Ницэ Л.К., Годова Г.В., Моторина М.В. Интенсивность фотосинтеза и активность фиксации азота в корневой зоне сельскохозяйственных растений // Минеральный и биологический азот в земледелии СССР. М.: Наука, 1984. С. 168–182.

Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во МГУ, 1980. 237 с.

Калининская Т.А., Редькина Т.В., Белов Ю.М. и др. Применение ацетиленового метода для количественного учета разных групп азотфиксаторов методов предельных разведений // Микробиология. 1981. Т. 50, № 5. С. 924–927.

Калининская Т.А., Иванов Н.П., Трунова О.Н. Изучение активности азотфиксации в каштановой почве с помощью ацетиленового метода // Физиолого-биохимические исследования растений и микроорганизмов. Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 1982. С. 28.

Котляр Л.Е. Физиологические аспекты накопления азота в вегетативных органах и зерне яровой пшеницы в зависимости от сорта и условий выращивания: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Казань, 1984. 21 с.

Родынюк И.С. Влияние генотипа пшеницы на формирование эффективной ассоциации с азотфиксирующими микроорганизмами // Бюл. ВНИ Сельхозмикробиологии, 1985. № 42. С. 54–56.

Скрипаль И.Г., Малиновская Л.П., Онищенко А.И. Метод выделения микоплазм – выездителей желтух растений // Микробиол. журн. 1984. Т. 46, № 1. С. 93–97.

Умаров М.М. Значение несимбиотической азотфиксации в балансе азота в почве: Обзор // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1982. № 1. С. 92–103.

Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация (особенности, продуктивность, значение в азотном балансе почв): Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1983. 45 с.

Чумаков М.И., Емцев В.Т. Модификация определения потенциальной нитрогеназной активности почвы ацетиленовым методом в условиях анаэробиоза // Изв. ТСХА. 1985. Вып. 2. С. 190–192.

Fujii T., Sano C., Jyama S., Hirota G. Nitrogen fixation in the rhizosphere of rice // Annu. Rep. Nat. Inst. Genet. 1978. N 29. P. 101–103.

Hardy R.W.F., Holste R.D., Jackson E.K. The acetylene reduction essay for N_2 -fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiol. 1968. Vol. 43. P. 1185–1207.

Hirota Y., Fujii T., Sano G., Jyama S. Nitrogen fixation in the rhizosphere of rice // Nature. 1978. Vol. 276. P. 416–417.

Rennile R.J., Larson R.I. Nitrogen fixation associated with disomic chromosome substitution lines of spring wheat // Canad. J. Bot. 1979. Vol. 57. P. 2771–2775.

Rennile R.J., Rannie D. Techniques for quantifying N_2 -fixation in association with non-legumes under field and greenhouse conditions // Canad. J. Microbiol. 1983. Vol. 29, N 8. P. 1022–1035.

Rice W.A., Paul E.A., Wetter L.R. The role of anaerobiosis in asymbiotic nitrogen fixation // Ibid. 1967. Vol. 13, N 7. P. 829–836.

Scher F.M., Ziegler J.S., Kloepper J.W. A method for assaing the root colonizing capacity of bacteria on maize // Ibid. 1984. Vol. 30. P. 151–157.

Thomas-Bauzon L., Weinhard P., Vilenkort P., Balandreau J. The spermosphere model. I. Its use in growing counting, and isolated N_2 -fixing bacteria from the rhizosphere of rice // Ibid. 1982. Vol. 28, N 8. P. 922–928.

Vose P.B. Development in N_2 -fixing system // Ibid. 1983. Vol. 29, N 8. P. 837–850.

МЕХАНИЗМ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО ВЛИЯНИЯ БАКТЕРИЙ РОДА AZOSPIRILLUM НА ВЫСШИЕ РАСТЕНИЯ

Т.В. Редькина

Институт микробиологии АН СССР, Москва

Бактерии рода *Azospirillum* – ассоциативные диазотрофные микроорганизмы, развивающиеся на корневой системе многих сельскохозяйственных растений. Попытки многих исследователей [Klucas, Pederson, 1981; Nur et al., 1980; Okon et al., 1977; Rennie, Larsen, 1979; Reinders, Vlassak, 1978; Sloger, Owens, 1976] получить эффективные ассоциации азоспириллы с важными сельскохозяйственными растениями в условиях полевых и вегетационных опытов путем использования приема инокуляции не привели к стабильному положительному результату. Это связано с недостаточным пониманием механизма взаимодействия микро- и макросимбионта в ассоциативном симбиозе и слабой изученностью факторов, влияющих на формирование эффективных ассоциаций.

Нами предпринята попытка определить пути влияния азоспириллы на высшие растения, в частности, показать роль генотипа растений и штаммовых особенностей азоспирилл в формировании ассоциаций с растениями. Влияние азоспириллы изучали на растениях риса и проса китайского.

Взаимодействие азоспириллы с растениями изучали в модельных опытах с пятью сортами проса китайского. Все использованные для инокуляции штаммы были выделены из почв Грузинской ССР, ризосфера кукурузы, риса и относились к виду *Azospirillum brasiliense*. Просо выращивали в водной культуре в течение 3 нед при естественном освещении. 3-дневные проростки инокулировали суспензией азоспириллы из расчета 50 млн клеток азоспириллы на одно растение. У использованных в опыте семян проса отсутствовали эпифитные азоспириллы. Азотфиксирующую активность определяли ацетиленовым методом на газовом хроматографе "Хром-3" в течение 21-дневной вегетации [Калининская и др., 1973].

У двух сортов *Setaria italica* var. *alba*, *Setaria italica* var. *dissecta* не обнаружено азотфиксющей активности в течение вегетации при инокуляции всеми испытанными штаммами азоспириллы. Однако в конце вегетации отмечено увеличение сухой массы инокулированных растений по сравнению с контрольными, т.е. выявлен четкий ростактивирующий эффект инокуляции азоспириллы. Все штаммы азоспириллы в ассоциации с этими сортами проявляют только свойства стимуляторов роста растений.

У сортов *Setaria italica* var. *cylindrica*, *Setaria italica* var. *rubrum*, *Setaria italica* var. *nigrum* обнаружена азотфиксующая активность при инокуляции всеми 5 штаммами азоспириллы. Интенсивность азотфиксации в системе растение–азоспирилла изменялась в зависимости от сорта проса и штамма азоспириллы. На рис. 1 показаны как суточная динамика азотфиксующей активности в течение вегетации, так и суммарная азотфиксующая активность за весь период вегетации у 3 сортов проса.

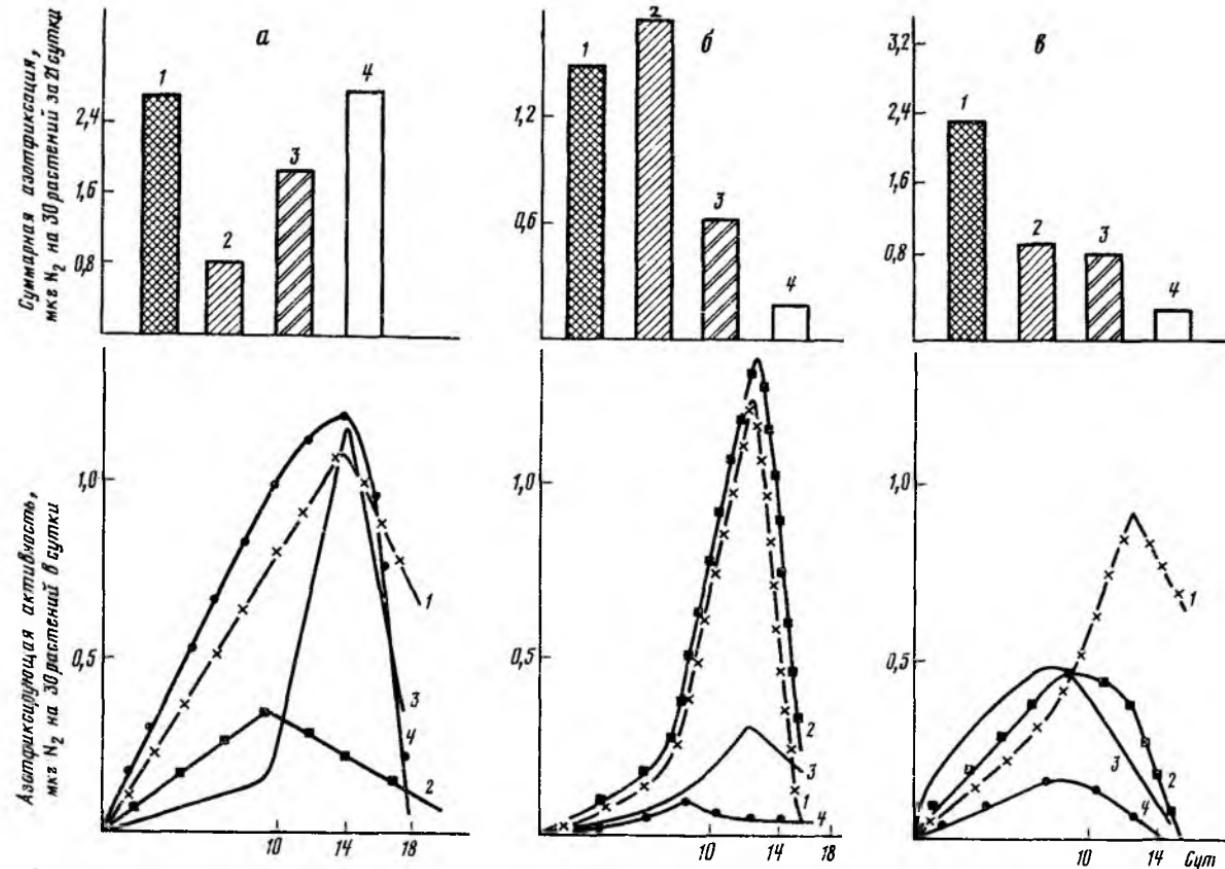


Рис. 1. Азотфикссирующая активность 4 штаммов азоспиреллы в ассоциации с *S. italicica* var. *cylindrica* (а), *S. italicica* var. *rubrum* (б), *S. italicica* var. *nigrum* (с)

1 — шт. Г₅; 2 — шт. Г₅; 3 — шт. Г₆; 4 — шт. 15р

Для сорта *Setaria italica* var. *cylindrica* наиболее эффективные азотфикссирующие ассоциации образуются со штаммами 15р, Г₃ и Г₆. Штаммы Г₃ и Г₅ обнаруживают высокую нитрогеназную активность в ассоциации с сортами *Setaria italica* var. *rubrum*. Сорт *Setaria italica* var. *nigrum* обеспечивает оптимальные условия для нитрогеназной активности только одного штамма — Г₃. Данный штамм Г₃, выделенный из ризосферы кукурузы, образует эффективные азотфикссирующие ассоциации со всеми 3 сортами проса. У разных сортов проса китайского обнаружена определенная специфичность в их взаимоотношениях с разными штаммами азоспиреллы. Наиболее эффективные условия для нитрогеназной активности испытанных штаммов азоспиреллы обеспечивает сорт *Setaria italica* var. *cylindrica*. Впервые на растениях *Setaria italica* четко показано существование 2 путей влияния азоспиреллы на растение: наличие ростактивирующего эффекта и увеличение азотфикссирующей активности в системе растение-азоспирелла. Выявлена доминирующая роль генотипа высших растений в формировании азотфикссирующей ассоциации азоспиреллы с растением. Штаммовым особенностям азоспиреллы принадлежит второстепенная роль в формировании ассоциативного симбиоза, определяющего только степень азотфикссирующей активности в системе.

Эти выводы были подтверждены в опыте с рисом. Опыт ставили с 17 сортами стерильных растений риса, инокулированными азоспиреллой. Стерильные семена риса получали путем предварительного лущения их с последующей двухэтапной стерилизацией: 0,1% раствором $HgCl_2$ в течение 20 мин смесью 96% C_2H_5OH и 30% H_2O_2 в течение 2 мин с последующим отмыванием стерильной водой. Для контроля стерильности семена риса помещали на чашки Петри с картофельным агаром. Через 2 сут проросшие семена помещали в конические колбы на 500 мл со стерильной водой. Одновременно семена риса инокулировали суспензией азоспиреллы из расчета 100 млн клеток азоспиреллы на одно растение. Для инокуляции использовали штамм 15р, выделенный из прорастающих семян риса. Растения риса выращивали в водной культуре 21 день. В течение всей вегетации измеряли азотфикссирующую активность системы рис-азоспирелла. В конце вегетации определяли сухую массу проростков и содержание в них общего азота.

Сорта риса по интенсивности азотфикссирующей активности разделили на 3 группы: Сальский, Дубовский-129, Спальчик, Жемчужный, Кубань-3, Приматчинский, Узрос — сорта высокой азотфикссирующей активности (50–114 мкг азота на 1 растение); Старт, Горизонт, Врос-3216, Авангард, Узбекский, Краснодарский-424 — сорта средней азотфикссирующей активности (20–50 мкг азота на 1 растение; 6 Альтаир, Новосельский, Лиман, Нукус — сорта низкой азотфикссирующей активности (3–20 мкг азота на 1 растение). Эти сортовые различия в азотфикссирующей активности, вероятно, объясняются разной степенью приживаемости азоспиреллы на корнях растений и неодинаковой степенью обеспеченности их энергией за счет корневых выделений растений.

Выявлены сложные соотношения в изменении азотфикссирующей активности, сухой массы растений, содержания общего азота у инокулированных растений (рис. 2). У риса сорт Спальчик отмечено незначительное увеличение сухой массы инокулированных растений, не превышаю-

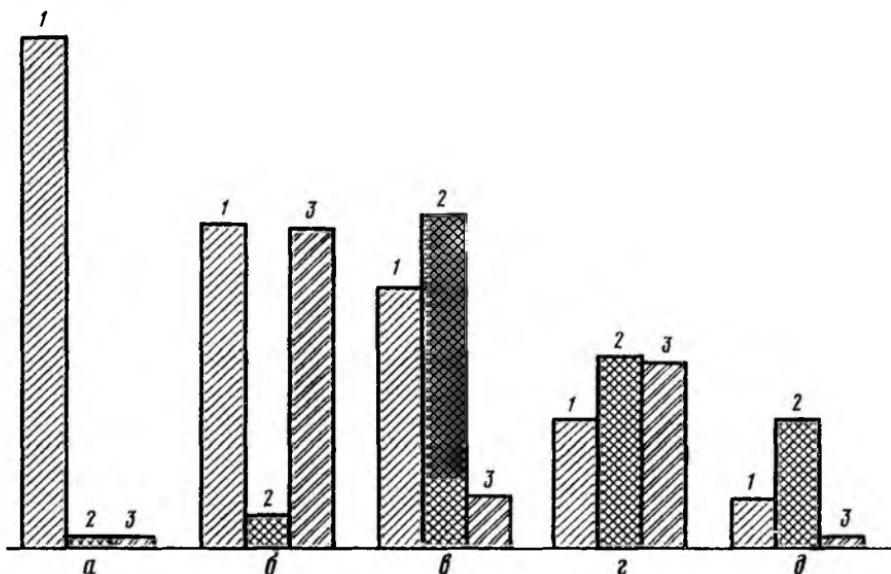


Рис. 2. Влияние *A. brasiliense* шт. 15р на рост и содержание общего азота у разных сортов риса в условиях стерильного опыта

а – Узрос; б – Сальчик; в – Приматчинский; г – Врос-3216; д – Альтаир; 1 – азотфикссирующая активность инокулированных растений, мкг N на 1 растение за 21 сут; 2 – прибавка сухой массы инокулированных растений, % к контролю; 3 – увеличение содержания азота у инокулированных растений, % к контролю

щее 7%. Увеличение количества общего азота у инокулированных растений составляет 72% по сравнению с контрольными. У сортов Приматчинский и Жемчужный отмечалась сильная стимуляция роста надземной массы растений, а также корневой системы, что увеличивало поглощающую поверхность корней и улучшало минеральное питание растений, способствуя более интенсивному их развитию (рис. 3).

Несмотря на высокую азотфикссирующую активность у сортов Узрос, Кубань-3, Сальский, не наблюдали ни увеличения сухой массы, ни повышения содержания общего азота у инокулированных растений. Реакция этих сортов на азоспиреллу дает основание предполагать слабую степень усвоения ими азота, фиксированного в ризосфере.

В группе сортов риса средней азотфикссирующей активности выявлены следующие соотношения определенных нами показателей. У сорта Врос под влиянием азоспиреллы отмечалось увеличение в равной степени как сухой массы растений, так и содержания общего азота соответственно на 42 и 44%. У инокулированных растений сорта Авангард – увеличение сухой массы растений на 63% и содержания общего азота на 17% по сравнению с контрольными. Аналогичные соотношения этих показателей отмечены у сортов Краснодарский-424 и Узбекский. Из этого опыта следует, что механизм взаимодействия азоспиреллы с разными сортами риса носит сложный характер и не ограничивается двумя путями влияния азоспиреллы на растения, а зависит также от степени усвоения растениями азота, фиксированного азоспиреллой.

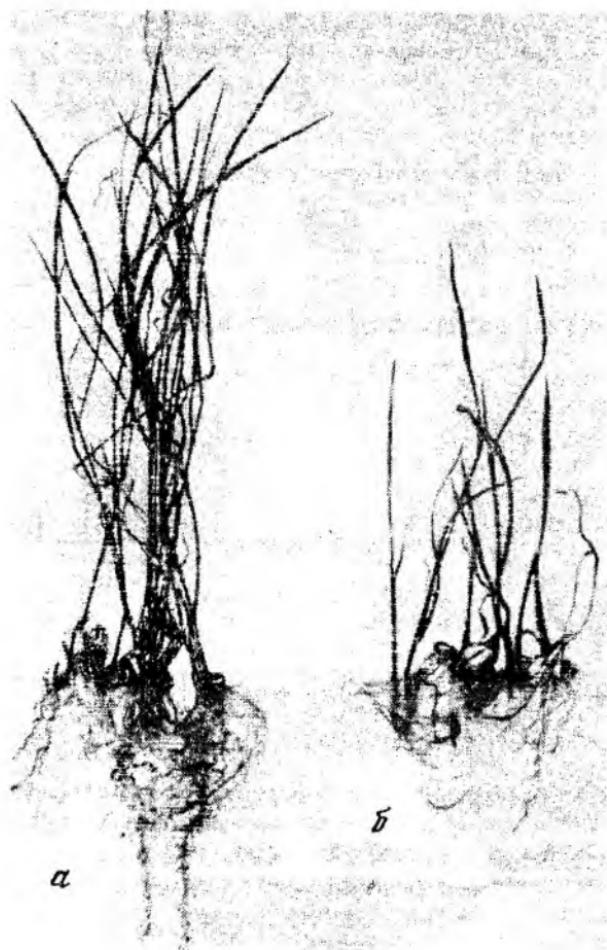


Рис. 3. Влияние азоспириллы *A. brasiliense* шт. 15р на 10-дневные проростки риса сорта Жемчужный
а – инокулированные растения; б – контроль

Для доказательства неодинаковой степени усвоения азота, фиксированного в ризосфере разных сортов риса, был поставлен опыт с $^{15}\text{N}_2$. Опыт ставили в стерильных условиях с двумя сортами риса – Сальский и Спальчик. Стерильные семена риса выращивали в специальных сосудах объемом 100 мл, снабженных боковыми отростками для взятия газовых проб. В каждом сосуде выращивали по 3 растения риса в водной культуре. Инокуляцию стерильных растений риса проводили суспензией азоспириллы (штамм 15р) из расчета 100 млн клеток азоспириллы на одно растение. На 10-е сутки сосуды с рисом заполняли газовой смесью, содержащей 30% $^{15}\text{N}_2$, 50% Ar и 20% O_2 . Инкубация риса в атмосфере изотопного азота продолжалась 7 сут. По окончании инкубации определяли общий азот в стеблях, корнях и суспензии азоспириллы. Для удаления азоспи-

Таблица 1

Усвоение азота, фиксированного азоспириллой, 17-дневными проростками риса, сортов Спальчик и Сальский в условиях монобактериальной культуры

Вариант	Избыток ¹⁵ N, атом, %	Общее содер- жание азота, фиксирован- ного азоспи- риллой, мкг	Азот, усвоенный растением		Распределение ¹⁵ N в растениях риса, %	
			мкг	в % от общего фикси- рованного азота	надземная часть	корни
Спальчик-1						
Стебли	0,117	7,29	3,18	43,56	73	26
Корни	0,053					
Суспензия	0,217					
Спальчик-2						
Стебли	0,064	4,78	1,52	31,81	68	33
Корни	0,037					
Суспензия	0,281					
Спальчик-3						
Стебли	0,216	8,59	4,56	53,01	76	24
Корни	0,088					
Суспензия	0,272					
Средние значения			6,83	3,08	43,00	72
Сальский-1						
Стебли	0,117	8,55	6,56	76,78	23	77
Корни	0,406					
Суспензия	0,026					
Сальский-2						
Стебли	0,194	9,54	9,28	98,25	37	63
Корни	0,486					
Суспензия	0,006					
Сальский-3						
Стебли	0,032	5,78	3,32	57,36	7	51
Корни	0,252					
Суспензия	0,127					
Средние значения			7,92	6,38	77,13	22
						63

риллы корни риса промывали в культуральной жидкости с последующим отмыванием стерильной водой. Определение содержания изотопного азота проводили на масс-спектрометре [Калининская, 1971].

Данные, представленные в табл. 1, показывают разную степень усвоения фиксированного азоспириллой азота. Для сорта Сальский поступление фиксированного азота в растения составляло 77% от общего количества, фиксированного азоспириллой, а для сорта Спальчик — 36%. Отмечается неодинаковое распределение фиксированного азота в надземной и корневой частях растений у этих сортов. У сорта Спальчик надземной массой усваивается 31%, корневой — только 11%; у сорта Сальский установлена обратная зависимость — надземной частью растений усваивается 20%, корневой массой — 57%.

Таблица 2

Фунгистатическое действие азоспириллы на почвенные грибы

Гриб, использованный как тест-объект	Штаммы азоспириллы							
	живущие в ассоциации							
	с ячменем	с овсяницей	с озимой пшеницей	с костром	с овсом	15 р	94-3	341
<i>Asp. versicolor</i>	—	—	±	—	—	±	—	—
<i>Asp. flavus</i>	±	+	—	—	—	—	+	—
<i>Asp. cyclopium</i>	—	—	+	—	—	+	+	—
<i>Asp. ruber</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Asp. candidus</i>	+	+	+	—	+	—	+	+
<i>Asp. sulphureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Asp. allilaceus</i>	+	+	—	—	—	—	—	—
<i>Asp. chevalieri</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Asp. flavipes</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Asp. amylovorus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. microsporus</i> 1360	—	—	—	—	—	—	—	±
<i>R. microsporus</i> 1063	±	—	—	—	±	—	—	—
<i>R. microsporus</i> 2018	+	+	—	—	—	—	+	—
<i>R. cohnii</i> 1218	+	+	—	—	—	—	+	—
<i>R. delemar</i> 1429	—	—	—	—	+	—	—	—
<i>Pen. brevicum</i> compostum	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pen. digitatum</i> 1296	+	+	—	—	+	—	+	—

Примечание. (—) – фунгистатического действия нет; тест-культуры; (+) – зона угнетения роста гриба более 10 мм.

(±) – фунгистатическое действие минимальное, не зарастал только блок

Впервые в условиях монобактериальной культуры изотопным методом с $^{15}\text{N}_2$ было определено поступление в растения риса азота, фиксированного азоспириллой. Показано быстрое усвоение фиксированного в ризосфере азота стерильными растениями риса. В данном случае доступными формами азота для растений являются не минеральные формы, а, вероятно, какие-то органические соединения азота в форме аминокислот и пептидов. Способность образовывать внеклеточные аминокислоты отмечена нами для ряда штаммов, выращенных на минеральной среде в условиях азотфиксации. Доминирующей аминокислотой была аспарагиновая кислота, возможно, она и есть транспортная форма азота, продуцируемая азоспириллой и легко усваиваемая растением.

Таким образом, бактерии рода *Azospirillum* — активные фиксаторы атмосферного азота. Азот, фиксированный азоспириллами легкодоступен для растений. Способность бактерий данной группы образовывать ростактивирующие вещества фитогормональной природы позволяет рассматривать их как стимуляторы роста растений [Tien et al., 1979].

Наряду с этими свойствами нами впервые показано, что азоспириллы способны продуцировать вещества антибиотической природы, подавляющие развитие грибов. Фунгистатическую активность азоспирилл определяли на широком спектре грибов родов: *Aspergillus* (23 штамма), *Rhizopus* (10 штаммов), *Penicillum* (4 штамма), *Fuzarium* (1 штамм). Как следует из данных табл. 2, испытанные штаммы азоспирилл обладали различной фунгистатической активностью. Наибольшим фунгистатическим действием обладали штамм 94-3, выделенный из серой лесной почвы, и эпифитные штаммы, выделенные из прорастающих семян овса и ячменя. *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus cohnii* оказались наиболее чувствительными к антибиотическим веществам, продуцируемым всеми штаммами азоспириллы. Рост *Penicillum brevicum compostum* подавлялся всеми испытанными штаммами азоспириллы. Из рода *Aspergillus* наиболее чувствительны к антибиотическим соединениям, продуцируемым всеми штаммами азоспириллы, были *Asp. ruber*, *Asp. sulphureus*, *Asp. chevalieri*, *Asp. flavipes*, *Asp. amylovorus*.

Фунгистатическая активность азоспирилл наблюдалась также в системе растение—гриб—азоспирилла. При прорастании семян яровой пшеницы, у которой отсутствовали эпифитные азоспириллы, наблюдали сильное грибное заражение. У семян яровой пшеницы с большой численностью эпифитных азоспирилл подобного явления не наблюдали (рис. 4). В опытах с проростками риса, пораженными грибом *Alternaria*, была показана защитная функция азоспирилл при инокуляции азоспириллами. Фунгистатическая активность бактерий рода *Azospirillum* является свойством, которое способно играть большую роль во взаимоотношениях данной группы бактерий с высшими растениями.

На основании приведенных данных можно сделать вывод о существовании сложного механизма взаимоотношений азоспириллы с высшими растениями, включающего образование эффективных азотфиксирующих ассоциаций растение—азоспирилла, разную степень усвоения растениями азота, фиксированного азоспириллой, ростактивирующий эффект, фунгистатическую активность. По-видимому, влияние азоспирилл на высшие растения не ограничивается перечисленными выше путями.

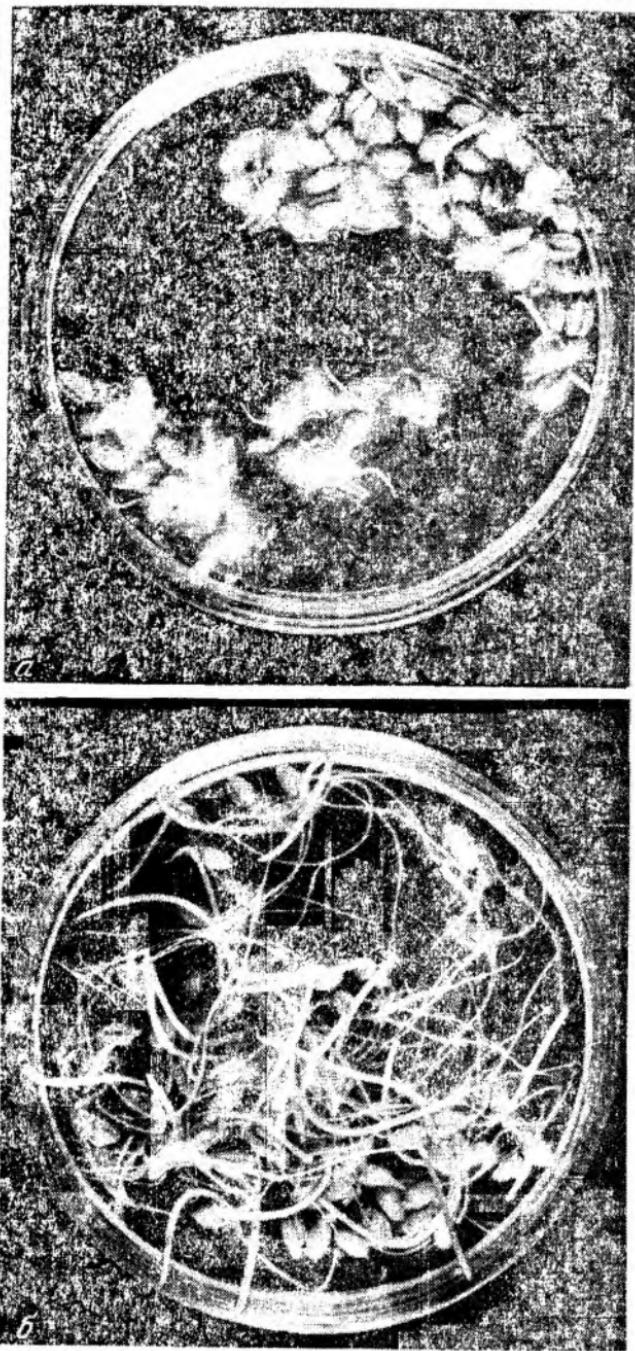


Рис. 4. Фунгицистическое действие азоспириллы в системе растение–гриб–азоспирилла
а, б – 5-дневные проростки яровой пшеницы Ершовская, пораженные грибной
инфекцией в отсутствие и в присутствии эпифитной азоспириллы соответственно

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Калининская Т.А. Использование $^{15}\text{N}_2$ для определения азотфикссирующей активности // Микробиологические и биохимические методы исследования почв. Киев: Урожай, 1971. С. 176–180.

Калининская Т.А., Rao В.Р., Волкова Т.Н., Ипполитов Л.Т. Определение азотфикссирующей активности почвы, занятой под рисом при помощи ацетиленового метода // Микробиология, 1973. Т. 42, № 3. С. 481–486.

Klucas K.V., Pederson W. Nitrogen fixation associated with roots and wheat // Nitrogen fixation / Ed. W.E. Newton, W.H. Orme-Johnson. Baltimore: Univ. press, 1981. Vol. 1. P. 243–255.

Nur J., Okon Y., Henis J. An increase in nitrogen content of *Setaria italica* and *Zeа mays* inoculated with *Azospirillum* // Canad. J. Microbiol. 1980. Vol. 26, N 4. P. 482–485.

Okon Y., Albrecht S.L., Burris R.H. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in associations with plants // Appl. and Environ. Microbiol. 1977. Vol. 33, N 1. P. 85–88.

Rennie R.J., Larsen R.I. Dinitrogen fixation associated with disomic chromosome substitution lines of Spring wheat // Canad. J. Bot. 1979. Vol. 57, N 7. P. 2771–2775.

Reynders L., Vlassak K.N. Nitrogen-fixation spirillum-plant root associations // Environ. Biogeochem. and Geomicrobiol. 1978. Vol. 2. P. 553–559.

Sloger C., Owens Z.D. N_2 -fixation by a temperate corn– *Spirillum* sp. association // II Intern. Symp. N_2 -fixation. Salamanca, 1976. P. 35–39.

Tien T.M., Gaskins M.H., Hubbell D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasiliense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.) // Appl. and Environ. Microbiol. 1979. Vol. 37, N 5. P. 1016–1024.

УДК 631.46:579.841

МЕТАН И ВОДОРОД КАК ИСТОЧНИКИ ЭНЕРГИИ ДЛЯ ПОЧВЕННЫХ АЗОТФИКСАТОРОВ

И.К. Кравченко

Институт микробиологии АН СССР, Москва

Анализируя данные, полученные отечественными и зарубежными исследователями, следует отметить, что весьма незначительно число работ по экологии аэробных азотфиксаторов, иных, чем бактерии рода *Azotobacter*. Это в значительной степени связано с несовершенством методических подходов. В подавляющем большинстве исследований учет количества и разнообразия аэробных диазотрофов проводят посевом на агаризованные питательные среды без источника азота с сахарами.

Наши исследования показали, что значительно большее количество и разнообразие диазотрофов можно выявить, используя в качестве критерия нитрогеназной активности высокочувствительный ацетиленовый тест и учитывая такие физиологические особенности азотфиксаторов, как микроаэрофильность и использование нетрадиционных источников энергии. Особый интерес представляет изучение диазотрофов, использующих продукты микробного анаэробного превращения органического вещества в затопляемой почве – метан и водород.

Образование водорода в анаэробных условиях затопленной почвы

под рисом может быть связано с деятельностью облигатных анаэробов и факультативно-анаэробных гетеротрофов [Кондратьева, Гоготов, 1981]. Содержание водорода в почвенном воздухе такыровидной почвы под рисом достигает 1%, а при внесении соломы увеличивается до 3,6% [Мищустин, Нелидов, 1982]. Почва характеризуется высокой активностью окисления водорода, она поглощает за год $16 \cdot 10^6$ т водорода [Ножевникова, Юрбанов, 1979]. Основную роль в окислении водорода, вероятно, играют хемолитотрофные бактерии, находящиеся в аэробных микрозонах, непосредственно сообщающихся с анаэробными, где происходит его образование [Conrad, Seiler, 1979].

Наличие в природе водородных бактерий представляет большой интерес. Наиболее полная современная характеристика этой группы дана в монографии Г.А. Заварзина [1978] и более поздних работах сотрудников его лаборатории. Впервые наличие нитрогеназной активности у микроорганизмов в условиях автотрофного роста за счет окисления водорода было показано для почвенной бактерии, описанной согласно определителю Красильникова как *Musbacterium flavum* [Федоров, Калининская, 1961]. В лаборатории Шлегеля аналогичная культура была описана как *Corynebacterium autotrophicus* [Gogotov, Schlegel, 1976]. В результате изучения большого количества микроорганизмов, выделенных из природных источников, водородокисляющие азотфикссирующие желтопигментированные бактерии были выделены в новый род *Xanthobacter* с двумя видами – *X. autotrophicus* [Wiegel et. al., 1978] и *X. flavus* [Malik, Claus, 1979]. В последние годы появились работы о водородокисляющих диазотрофах, отличающихся от бактерий рода *Xanthobacter*. Они были определены как *Alcaligeves latus* [Schlegel, 1981], *Achromobacter superficiales* var. *azotohydrogenovora* [Калининская и др., 1981б], *Pseudomonas saccharophila* [Barraquio et al., 1986]. Показана нитрогеназная активность за счет окисления водорода у *Dexia gummosa* [Shankar et al., 1986] *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Mycrocyclus*, *Renobacter* [Bowien, Schlegel, 1981].

Данные о роли водорода как источника энергии для почвенных азотфиксаторов до настоящего времени были весьма ограничены [Калининская и др., 1980]. Нами дана оценка потенциальной активности водородных азотфиксаторов почв рисовых полей ряда районов СССР. Определение азотфикссирующей активности образцов почв рисовых полей при инкубации в атмосфере водородной газовой смеси (H_2 – 40%, CO_2 – 10%, воздух – 50% по объему) показало, что количество азота, связанного почвенными бактериями, в этом случае значительно возрастает по сравнению с контролем. Например, для лугово-черноземовидной почвы активность азотфиксации в контроле составляла 0,05 мг азота, а при инкубации с водородом – 4,16 мг. Для такыровидной почвы активность возросла с 0,43 до 7,89 мг азота.

Практически отсутствуют литературные данные о распространении водородокисляющих диазотрофов в почве. Разработанный в Институте микробиологии АН СССР количественный способ оценки этих микроорганизмов в почве [Калининская и др., 1981а] позволил получить такие результаты для ряда почв (см. ниже).

Район, почва *	Количество диазотрофов, 10 ³ клеток на 1 г почвы
Казахская ССР	
такыровидная	4500
Краснодарский край	
луговая	2,5
перегнойно-глеевая	6,0
лугово-черноземовидная	60,0
УССР	
южный чернозем	60,0

*Срок отбора образцов — сентябрь, глубина отбора — 0—10 см.

Как показали наши исследования, водородокисляющие диазотрофы распространены во всех изученных почвах рисовых полей. В большинстве почв их количество невелико и варьирует от 2 до 60 тыс. клеток на 1 г почвы. Исключением является такыровидная почва, в которой количество этих бактерий достигает 2,5—4,5 млн клеток, составляя одну из ведущих по численности групп диазотрофов.

Изучение накопительных культур водородокисляющих диазотрофов показало, что они представляют собой многокомпонентные устойчивые комплексы, в состав которых входят бактерии родов *Xanthobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*. Исследованиями последних лег установлено, что водородокисляющие диазотрофы развиваются ассоциативно и преимущественно в ризосфере растений риса [Watanabe et al., 1982].

Почвы рисовых полей — один из важнейших природных источников метана, конечного продукта превращения органического вещества в анаэробных условиях затопленной почвы. Глобальное выделение метана почвами под рисом оценивают в $270 \cdot 10^6$ т в год [Бонч-Осмоловская, 1979]. Образование метана — результат деятельности сложной синтрафной ассоциации метанообразующих бактерий и анаэробов, осуществляющих разложение органического вещества [Заварзин, Бонч-Осмоловская, 1981].

В лабораторных и полевых опытах установлено, что на количество образующегося в почве метана существенно влияет внесение органического вещества и минеральных соединений. В полевых опытах внесение фосфорных удобрений увеличивало выделение метана в 3 раза, а соломы — в 25—60 раз [Agaragi, Tangeham, 1979]. Нами в лабораторных условиях показано, что внесение углеродсодержащих веществ в почву увеличивало количество выделяющегося метана в 50—200 раз. Наибольший эффект был получен при добавлении уксусной кислоты, соломы и метанола. Так, например, в такыровидной почве количество метана, выделяющегося образцами без внесения дополнительных источников углерода, было 0,04 мкг на 1 г почвы за 1 сут. При внесении 0,2% глюкозы оно возрастало до 2,62 мг, органических кислот — 1,59—4,20 мг, соломы — 4,67 мг, метанола — 10,66 мг.

Еще в ранних работах по почвенной микробиологии было отмечено, что воздействие природного газа на почву вызывает увеличение содержания общего азота [Нарег, 1939]. Этот факт получил объяснение в более поздних работах, когда из таких почв были выделены метан-

окисляющие бактерии, способные фиксировать атмосферный азот [Davis et al., 1964]. С помощью ацетиленового и изотопного методов была доказана способность к азотфиксации у широкого набора облигатных метанокисляющих бактерий [Романовская и др., 1980]. У факультативных метилотрофных бактерий способность к азотфиксации за счет использования одноуглеродных соединений, отличных от метана, определена лишь для бактерий рода *Xanthobacter* при росте на среде с метанолом [Чистякова, Калининская, 1982].

Почвы рисовых полей обладают большими потенциальными возможностями окисления метана. Методом газовой хроматографии нами изучено окисление метана комплексом микроорганизмов почв рисовых полей (табл. 1). В среднем скорость окисления метана была $0,06\text{--}0,08$ мг на 1 г почвы за 1 сут. Микроорганизмы, окисляющие метан, составляют до 40–90% от общего количества бактерий в почвах, обогащенных метаном [Малашенко и др., 1978]. В изученных нами почвах рисовых полей число метанокисляющих микроорганизмов колеблется от $6,0 \cdot 10^4$ до $6,0 \cdot 10^6$ клеток на 1 г почвы, а количество азотфиксаторов из них составляет от 30 до 70%.

Экология метилотрофных азотфиксаторов изучена слабо. Существует мнение о незначительности их вклада в азот почв под рисом [de Bont et al., 1978]. Нами дана оценка потенциальных возможностей метанокисляющих диазотрофов. Для этого с помощью изотопного метода мы сравнивали азотфиксирующую активность почв под рисом при инкубации образцов в газовой смеси с метаном и без него [Чистякова и др., 1982]. Инкубация с метаном увеличивает количество азота, фиксированного почвенными бактериями, в 10–100 раз (табл. 2). За месяц инкубации оно может достичь 30–45 мг азота на 1 кг почвы. Продуктивность использования метана комплексом диазотрофов составляет в среднем 10–12 мг азота при окислении 1 г метана.

На наш взгляд, существуют 2 наиболее вероятные причины возрастания нитрогеназной активности при инкубации с метаном. Первая – активизация самих метанокисляющих азотфиксаторов, вторая – активизация трофически связанных с ними метанокисляющих микроорганизмов. Представители всех известных родов облигатных метанокисляющих микроорганизмов способны к азотфиксации. Развитие метанокисляющих бактерий ведет к образованию веществ, которые могут быть использованы гетеротрофными азотфиксаторами. В почвах под рисом, где в результате затопления количество кислорода невелико, происходит неполное микробное окисление метана. Наибольший интерес среди образующихся промежуточных продуктов представляет метанол, который используют как облигатные, так и факультативные метилотрофы различных таксономических групп. Для оценки потенциальных возможностей азотфиксаторов, усваивающих метанол, мы измеряли нитрогеназную активность почвенных образцов при внесении метанола в количестве 2 мг на 1 г почвы. Нитрогеназная активность в этом случае возрасала в 6–30 раз.

Одна из причин слабой изученности метилотрофных азотфиксаторов в природных объектах состоит в отсутствии методов их количественного учета. Нами был разработан такой метод [Чистякова, Калининская, 1982]

Таблица 1

Окисление метана микроорганизмами почв рисовых полей

Район, почва	Количество метана, мг/г почвы					Скорость окисления метана, мг CH_3 на 1 г почвы за 1 сут	
	Время наблюдения, сут						
	0	3	4	7	10		
Краснодарский край							
перегнойно-глеевая	3,15	1,70	0,65	0,14	0,02	0,08	
луговая	2,50	0,10	0,01	0	0	0,08	
лугово-черноземо-видная	2,70	1,24	0,59	0,07	0	0,07	
УССР							
южный чернозем	3,10	2,24	0,48	0,32	0,15	0,07	
Казахская ССР							
такыровидная	2,90	2,15	1,48	0,46	0,03	0,06	

Таблица 2

Влияние метана на азотфиксирующую активность в образцах почв под рисом

Район, почва	Контрольная газовая смесь*		Газовая смесь с метаном**	
	избыток ^{15}N в почве, атом.%	зафиксированный азот, мг на 1 г почвы за 30 сут	избыток ^{15}N в почве, атом.%	зафиксированный азот, мг на 1 кг почвы за 30 сут
Краснодарский край				
лугово-черноземо-видная	0,023	1,15	1,499	32,33
луговая	0,010	0,76	0,874	18,35
перегнойно-глеевая	0,003	0,25	0,707	26,46
УССР				
южный чернозем	0,019	0,92	2,129	45,65
темно-каштановая	0,015	0,63	0,533	9,89
Казахская ССР				
такыровидная	0,013	0,27	0,787	7,34

* 30% $^{15}\text{N}_2$, 20% O_2 , 50% Ar ; избыток атом.% ^{15}N в N_2 составлял 40%.** 30% $^{15}\text{N}_2$, 20% O_2 , 6–12% CH_4 , 38–44% Ar ; избыток атом.% ^{15}N в N_2 составлял 90%.

и с его помощью определено количество диазотрофов в разных типах почв рисовых полей. Численность этих азотфиксаторов колеблется от $2,5 \cdot 10^3$ до $4,5 \cdot 10^6$ клеток на 1 г почвы в зависимости от типа почвы. Метилотрофные азотфиксаторы, не учитывающиеся ранее, составляют значительную часть комплекса диазотрофов почв рисовых полей. Особенно велика их доля в такыровидных почвах КазССР, где они – ведущая по численности группа диазотрофов. В состав метилотрофных азотфиксирующих ассоциаций входят представители родов *Xanthobacter*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*. В такыровидных почвах КазССР в 40–70% таких ассоциаций входят бактерии рода *Xanthobacter*.

Использование новых методических подходов в изучении почвенных азотфикссирующих бактерий позволило показать, что водородные и метилотрофные диазотрофы распространены во всех изученных почвах и составляют важную часть комплекса азотфиксаторов. В почвах с высокой скоростью минерализации органического вещества, пример которых — такыровидная почва, они ведущая по численности группа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бонч-Осмоловская Е.А. Образование метана сообществами микроорганизмов // Успехи микробиологии. 1979. Вып. 14. С. 106–124.

Заварзин Г.А. Водородные бактерии и карбоксидобактерии. М.: Наука, 1978. 208 с.

Заварзин Г.А., Бонч-Осмоловская Е.А. Синтрофные взаимодействия в сообществах микроорганизмов // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1981. № 2. С. 165–173.

Калининская Т.А., Мамутов Ж.У., Нелидов С.Н. Фиксация азота в засоленных такыровидных почвах Акталинского массива орошения при внесении в них соломы // Повышение продуктивности почв Казахстана. Алма-Ата: Наука, 1980. С. 166–171.

Калининская Т.А., Редькина Т.В., Балов Ю.М. и др. Применение ацетиленового метода для количественного учета разных групп азотфиксаторов методом предельных разведений // Микробиология, 1981. Т. 50. С. 924–927.

Калининская Т.А., Редькина Т.В., Зубко А.К. Новые формы азотфиксаторов, обнаруженные в почвах Краснодарского края // Микробные сообщества и их функционирование в почве. Киев: Наук. думка, 1981. С. 208–215.

Кондратьева Е.Н., Гоготов И.Н. Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. М.: Наука, 1974. 125 с.

Малащенко Ю.Р., Романовская В.А., Троценко Ю.А. Метанокисляющие микроорганизмы. М.: Наука, 1978. 197 с.

Мишиустин Е.Н., Нелидов С.Н. Удобрение соломой такыровидных почв, осваиваемых под рисосеяние // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1982. № 5. С. 645–656.

Ножевникова А.Н., Юрбанов Л.Н. Цикл атмосферной окиси углерода и использование ее бактериями // Роль микроорганизмов в круговороте газов в природе. М.: Наука, 1979. С. 178–205.

Романовская В.А., Людченко Е.С., Соколов И.Г., Малащенко Ю.Р. Фиксация молекулярного азота метанокисляющими бактериями // Микробиол. журн. 1980. Т. 42. С. 683–688.

Федоров М.В., Калининская Т.А. Новый вид азотфикссирующей микробактерии и ее физиологические особенности // Микробиология. 1961. Т. 30. С. 833–839.

Чистякова И.К., Калининская Т.А. Определение количества метилотрофных азотфикссирующих бактерий в почвах под рисом // Там же. 1982. Т. 51. С. 1013–1015.

Чистякова И.К., Калининская Т.А., Миллер Ю.М. Метан как источник углерода и энергии для азотфикссирующих бактерий в почвах под рисом // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1982. № 3. С. 428–432.

Araragi M., Tangcham B. Effect of rice straw on the composition of volatile soil gas and microflora in the tropical paddy fields // Soil Sci. and Plant Nutr. 1979. Vol. 25. P. 283–295.

Barraquio W.L., Padre B.C., Watanabe J., Knowles R. Nitrogen fixation by *Pseudomonas Saccharophila* Doudoroff ATCC 15946 // J. Gen. Microbiol. 1986. Vol. 132. P. 237–241.

De Bont J.S., Lee K.K., Bouldin D.F. Bacterial oxidation of methane in the rice paddy // Ecol. Bull. 1978. Vol. 26. P. 91–96.

Bowien B., Schlegel H.J. Physiology and biochemistry of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria // Annu. Rev. Microbiol. 1981. Vol. 35. P. 405–452.

Conrad R., Seiler W. Field measurements of hydrogen evolution by nitrogen-fixing legumes // Soil Biol. and Biochem. 1979. Vol. 11. P. 689–690.

Davis J.B., Cory V.F., Stanley J.P. Atmospheric nitrogen fixation by methane-oxidizing bacteria // J. Bacteriol. 1964. Vol. 82. P. 468–472.

Gogотов И.Н., Schlegel H.J. Enrichment and isolation of nitrogen-fixing hydrogen bacteria // Arch. Microbiol. 1976. Vol. 107. P. 139–147.

Harper H.J. The effect of natural gas on the growth of microorganisms and accumulation of nitrogen and organic matter in the soil // *Soil Sci.* 1939. Vol. 48. P. 461–466.

Malik K.A., Claus D. *Xanthobacter flavus*, a new species on nitrogen fixing hydrogen bacteria // *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 1979. Vol. 29. P. 283–287.

Shankar H.N.R., Kennedy I.R., New P.B. Autotrophic growth and nitrogen fixation in *Derxia gummosa* // *J. Gen. Microbiol.* 1986. Vol. 132. P. 1797–1803.

Watanabe I., Barraquio W.L., Daroy M.L. Predominance of hydrogen-utilizing bacteria among N_2 -fixing bacteria in wetland rice roots // *Canad. J. Microbiol.* 1982. Vol. 28. P. 1051–1054.

Wiegel J., Wilke D., Baumgarten J. et al. Transfer of the nitrogen-fixing hydrogen bacterium *Corynebacterium autotrophicum* Baumgarten et al. to *Xanthobacter* gen. nov. // *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 1978. Vol. 28. P. 573–581.

УДК 631.461/51:576.8

АЗОТФИКСИРУЮЩИЕ ЦИАНОБАКТЕРИИ И ИХ ЭКОЛОГИЯ В ПАХОТНЫХ ПОЧВАХ УМЕРЕННОЙ ЗОНЫ

Е.М. Панкратова

Кировский сельскохозяйственный институт
Цианобактерии и плодородие пахотных почв

Цианобактерии, ранее называвшиеся синезелеными водорослями, в последнее время привлекают пристальное внимание из-за способности к масштабному размножению в пахотных почвах и в силу этого – влияния на их плодородие. В отдельные периоды цианобактерии вызывают изменение окраски самого поверхностного слоя почвы, которое нельзя не заметить. По аналогии с "цветением" воды это явление получило название "цветения" почвы. В это время цианобактерии обрастают мелкие комочки почвы и трещины, образуют на поверхности почвы темно-зеленые, иногда почти черные налеты, мелкие гроздевидные пузырьки, слизистые пленки и плотные корочки. Численность их клеток на 1 см² поверхности "цветущей" почвы достигает десятков тысяч и десятков миллионов. Цианобактерии настолько быстро размножаются, что мало приметное еще утром изменение окраски почвы становится очевидным к вечеру. Среднее время удвоения численности клеток (биомассы) или время генерации может колебаться от 14 до 111 ч, так как зависит от конкретной экологической обстановки [Перминова и др., 1982; Домрачева и др., 1986].

Развитие цианобактерий в почве оценивается положительно для ее плодородия. Показано, что в качестве азотфиксаторов функционирует около 130 видов цианобактерий [Панкратова, 1985]. Получены сведения о накоплении ими азота в пахотных почвах (табл. 1). Размеры азотонакопления колеблются в широких пределах от 2 до 51 кг/га в год и зависят от конкретных экологических условий, складывающихся в почвах пахотных полей.

С массовым развитием цианобактерий связывают повышенную биологическую активность почв, полагая, что она поддерживается поступлением их быстро обновляющейся биомассы. За год продукция цианобактерий на

Таблица 1

Накопление азота в результате усвоения N_2 цианобактериями на пахотных почвах

Местонахождение	Культура	Накопление азота, кг/га в год	Литературный источник
СССР, Нечерноземная зона	Озимая рожь	5–11	Панкратова, 1981
ГДР	Пшеница	До 2	Jahnke, 1967
Швеция, Уппсала	Пшеница	15–51	Henriksson et al., 1975
Англия, Бродбок	Бессменная пшеница	До 30	Дарт, Дэй, 1979
Англия, Бродбок	Озимая пшеница	4–28	Witty, 1979; Witty et al., 1979

пахотных почвах Нечерноземной зоны РСФСР составляет в сухом веществе 113–240 кг/га [Панкратова, 1985]. Парадоксально, что, несмотря на очевидную незначительность биомассы цианобактерий по сравнению с количеством органического вещества, привносимого в почву растительностью, именно цианобактерии в известные периоды являются мощным средообразующим фактором для гетеротрофных почвенных бактерий. При цветении почвы наблюдается выраженная профильная микростратификация последних с концентрированием в очагах размножения автотрофных цианобактерий [Домрачева и др., 1986]. Это объясняется тем, что бесхлорофильные бактерии, значительно меньшие размером, находят в слизи цианобактерий более оптимальные гидротермические условия, чем в окружающей почве, используют в качестве энергетического материала прижизненные внеклеточные выделения [Панкратова, 1981] и органическое вещество цианобактерий, принимая участие в их деструкции [Панкратова, Мезенцева, 1985а].

Улучшают за счет азотфикссирующих цианобактерий условия питания азотом грибы и водоросли [Панкратова, 1985], а также почвенные беспозвоночные [Домрачева, 1974; Nekrasova et al., 1976]. Сосудистые же растения, прежде чем быть усвоенными этой группой животных, должны отмереть и колонизироваться грибами и бактериями, которые превратят растительные остатки в доступный для беспозвоночных детрит [Shimmel, Darley, 1985]. Таким образом, в локусах массового развития автотрофные по углероду и азоту цианобактерии оказывают влияние на почвенную биоту, а через нее и на плодородие почвы.

Появились сообщения о закреплении азота и углерода цианобактерий в органическом веществе почвы [Vergta, Martin, 1976, Мезенцева, 1982; Панкратова, Мезенцева, 1985б], что снова подчеркивает пусть небольшую в этом плане, но положительную их роль в плодородии почвы.

Можно отметить также противоэрзационную роль нитчатых форм цианобактерий, слизистые вещества влагалищ и клеточных оболочек которых склеивают почвенные частицы, а переплетающиеся нити механически скрепляют их [Штина, Голлербах, 1976].

Наконец показано, что азот, накопленный цианобактериями, может

утилизироваться высшим растением, таким путем частично удовлетворяющим свою потребность в этом дефицитном элементе [Панкратова, 1987].

Все сказанное заставляет признать указанную группу микроорганизмов агрономически интересной и объясняет развитие работ по экологии цианобактерий в пахотных почвах.

ЭКОЛОГИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ В ПАХОТНЫХ ПОЧВАХ

Первые исследования в области экологии были связаны с выявлением факторов среды, ограничивающих массовое развитие цианобактерий, и с выяснением их влияния прежде всего на процесс азотфиксации, который в итоге оказался наиболее изученным. В последующем было установлено, что цианобактерии не представляют собой монолитную группу. Они отличаются исключительным физиологическим разнообразием по отношению к наличию кислорода в среде обитания, степени автотрофии и водному обмену, температуре, pH почвенного раствора и т.д. Соответственно совершенно различны и занимаемые ими экологические ниши. В то же время давно известны необычные адаптационные возможности некоторых видов цианобактерий, которые определяют их высокую экологическую валентность и, как следствие этого, объясняют космополитизм таких видов. Сказанное подчеркивает, что достоверность выводов, вытекающих из экологических исследований, во многом будет зависеть от правильности идентификации цианобактерий на уровне рода, вида и даже более мелкого таксономического ранга.

К настоящему времени достаточно подробно описана так называемая "усредненная" экология цианобактерий, относящаяся преимущественно к целинным местообитаниям. Этих сведений с позиций практической агрономии недостаточно. Возникла необходимость выяснения условий жизнедеятельности для цианобактерий при воздействии на почву многообразных сельскохозяйственных приемов, т.е. условий, не встречающихся в целинных биотопах. Это позволит, с одной стороны, подойти к возможности стимулирования развития цианобактерий в пахотных почвах, с другой – использовать их для наблюдения за текущим состоянием почвенного плодородия.

Виды азотфиксирующих цианобактерий, наиболее часто вызывающие "цветение" пахотных почв Нечерноземной зоны СССР, – это виды рода *Cylindrospermum* (*C. licheniforme*, *C. muscicola*, *C. stagnale*) и рода *Nostoc* (*N. muscorum*, *N. linckia*, *N. paludosum*, *N. punctiforme*). С меньшей численностью клеток в поверхностных разрастаниях развиваются *Anabaena variabilis*, *A. cylindrica*, *Tolyphothrix tenuis*. Еще меньшая численность клеток характерна для видов родов *Scytonema* и *Stigonema*.

В освоенных под луга биогеоценозах южных тундр (мятликовые луга) в массе развиваются виды родов *Nostoc* и *Stigonema* [Перминова и др., 1982], при незначительном числе видов из родов *Anabaena*, *Cylindrospermum*, *Tolyphothrix*.

Основными видами, часто образующими сплющную пленку на поверхности почвы в Бродбоке, оказались *N. elipsosporum*, *N. punctiforme* при участии видов рода *Cylindrospermum* [Дарт, Дэй, 1979].

В пахотных почвах ФРГ главным образом встречаются *C. licheniforme*, *C. muscicola*, *A. variabilis* и некоторые виды рода *Nostoc* [Jahnke, 1967]; в почвах Швеции *A. variabilis*, *N. microscopicum*, *C. licheniforme* [Henriksson et al., 1975].

Время возникновения и длительность цветения почвы. Причины, вызывающие массовое размножение азотфикссирующих цианобактерий, до сих пор неясны. Однако известно, что в умеренной зоне "цветение" почвы начинается одновременно под самыми различными культурами и на разных типах почвы, но с разной интенсивностью. Это дает основание для гипотезы, что явление контролируется больше метеорологическими условиями, чем чисто эдафическими факторами. Однако не исключено, что первые могут инициировать вспышку размножения опосредованно, т.е. через внутриценозную смену группировок микроорганизмов почвы, определяющую в ней физиолого-биохимические процессы и благоприятную ситуацию для увеличения пула цианобактерий. Уровень пула, при котором появляется шанс для бурного размножения цианобактерий, вплоть до появления толстых слоев, пока неизвестен. Высказано мнение, что при инокуляции ($4 \cdot 10^{11}$ клеток на 400 л, внесенных на га) он должен быть около 4 тыс. клеток на 1 см² почвы [Cole, 1977]. Заметим, что во многих почвах численность автохтонных клеток цианобактерий находится на уровне, который не инициирует их бурное размножение.

Таким образом, ключ к разгадке причин "цветения" почвы может быть найден лишь при выявлении благоприятных сочетаний климатических и эдафических факторов для размножения цианобактерий.

Значительное размножение цианобактерий на почвах Нечерноземной зоны, как правило, наблюдается в конце лета (реже – в конце июля, чаще – в августе) и в начале осени (табл. 2). Цветение прекращается после осенних обработок почвы – лущения и зяблевой вспашки, при которых разрастания цианобактерий оказываются погребенными под слоем почвы.

Можно выделить ряд факторов, оказывающих влияние на размножение цианобактерий в почве.

Влияние культивируемых растений. Растения прямо и косвенно влияют на саму возможность появления массовых разрастаний цианобактерий. Прямое их влияние связано со степенью затенения и занятости поверхности почвы. Косвенное – определяется особенностями агротехники: частотой механической обработки почвы, внесением удобрений и извести, использованием гербицидов.

Цианобактерии плохо размножаются под пропашными культурами, клевером второго года пользования, горохом, вико-овсяной смесью и другими бобово-злаковыми "мешанками", имеющими большое проективное покрытие листьями поверхности почвы. Разрастания цианобактерий обычно обнаруживаются на полях, занятых озимой рожью (в конце ее созревания), на садовых участках (под земляникой), под клевером первого года, под яровыми зерновыми, под многолетними злаковыми травами, т.е. там, где поверхность почвы сравнительно долго не обрабатывается и достаточно освещена. Если зерновые перед обмолотом предварительно скашиваются в валки, то очаги цветения почвы локализуются между ними. Летние обработки междуурядий у пропашных культур и окучивание

Таблица 2

Азотфиксирующие цианобактерии в поверхностных разрастаниях на почве

Почва	Срок наблюдения	Растение	Виды цианобактерий	Численность, тыс. кл/м ²	Литературный источник
Дерново-подзолистая	Осень	Овес	<i>A. variabilis</i>	340,6—1177,8	Помелова, 1971
	Весна—осень	"	<i>C. muscicola</i>	1846,0—3811,8	То же
	То же	"	<i>N. punctiforme</i>	93,6	"
	Август	Сеянный луг	<i>N. muscorum</i> , <i>T. tenuis</i> , <i>A. variabilis</i>	25321	Панкратова, 1981
	Сентябрь	Озимая рожь	<i>C. licheniforme</i>	2200	То же
		Пшеница (стерня)	<i>Cylindrospermum</i> spp.	21639,0	Наши данные
		То же	<i>Nostoc</i> spp.	885,0	Домрачева, Штина, 1985
		Клевер	<i>Cylindrospermum</i> spp.	3109,0	То же
		То же	<i>Nostoc</i> spp.	195,7	"
		Рожь (стерня)	<i>Cylindrospermum</i> spp.	16,7—70,3	"
Серная лесная	Июль	Озимая рожь	То же	3107,3	Носкова, 1968
Дерново-луговая	Сентябрь	Земляника	<i>C. catalatum</i>	5198,0	Домрачева, Штина, 1985
	То же	Корнеплоды	То же	3213,0	То же

картофеля задерживают "цветение" почвы, которое на этих полях возникает только в конце вегетации растений.

Влияние температуры и влажности почвы и воздуха. Наибольшие требования разрастания цианобактерий на пахотных почвах предъявляют к влаге, нежели к теплу. Возникшая в конце лета и осенью, они легко переносят раннеосенние заморозки — "холодовые шоки" — и быстро возобновляют после них физиологические процессы, в частности азотфиксацию [Панкратова, 1979]. При этом интенсивность "цветения" почвы не ослабевает. Если почва осенью не обрабатывается, то функциональная активность цианобактерий сохраняется вплоть до выпадения снега и обнаруживается даже после повторных снеготаяний. Прочный снеговой покров, приводящий к замерзанию почвы, вызывает гибель клеток цианобактерий [Панкратова, 1981].

Активно функционируют цианобактерии только в достаточно увлажненной почве, но без ее затопления. Сильные летние дожди механически разбивают пленки и вмывают клетки в более глубокие слои почвы. Цианобактерии легко переносят повторяющиеся высыхания поверхности почвы и быстро возобновляют свою активность после регидратации [Панкратова, 1987]. Достоверно положительное влияние на увеличение их численности

и биомассы оказывает повышенная влажность воздуха [Перминова и др., 1982], сочетающаяся с перепадом дневных иочных температур [Штина, 1986], во время которого пленки цианобактерий увлажняются капельно-жидкой водой ("лакируются"). Указанный механизм увлажнения поверхности почвы систематически функционирует в осенние месяцы при относительно высокой влажности воздуха и колебаниях дневных и пониженныхочных температур. Вероятно предположение, что бурное развитие цианобактерий в осенние месяцы связано со стабилизацией для них условий водного режима.

Влияние рН. Почвенная кислотность долго признавалась фактором, регулирующим расселение цианобактерий на земной поверхности. Считалось, что цианобактерии принадлежат к базифильной группе организмов или, в лучшем случае, являются нейтралофилами [Штина, Голлербах, 1976]. Наши результаты заставляют пересмотреть вопрос о границах толерантности к кислым значениям рН многих азотфикссирующих видов. Исследования [Панкратова, 1981, 1987] были проведены в Нечерноземной зоне, в которой площадь сильнокислых и среднекислых почв составляет более половины площади пашни. Дополняя ранее опубликованные данные, приводим результаты, полученные в августе и сентябре 1984 г. в трех районах Кировской области. Было обследовано 35 полей, занятых овсом, смесью овса и клевера, ячменем, рожью, и собрано 140 образцов почвы с участков явно выраженного "цветения". Кислотность почвы определяли потенциометрически, а пробы микроскопировали. Установлено, что цветение почвы было вызвано видами *Cylindrospermum* с небольшой примесью видов рода *Nostoc*. Из обследованных участков 63,6% имели рН водной вытяжки в пределах 5,0–6,0 (из них 21% – в интервале 5,0–5,5) и 57,5% – рН солевой вытяжки в пределах 4,0–5,0 (из них 22% – 4,0–4,5). Следовательно, кислые значения рН почвенного раствора не ограничивали массовое размножение цианобактерий. Однако при приближении значений рН к нейтральному показателю плотность популяции цианобактерий и их азотфиксация возрастали [Панкратова, 1987].

Условия минерального питания. Цианобактерии чутко реагируют на изменение условий минерального питания. Известкование увеличивает их численность [Третьякова, Балезина, 1981], а также азотфикссирующую активность [Панкратова, 1987] в дерново-подзолистой почве.

Цианобактерии быстро размножаются при внесении на дерново-подзолистых почвах фосфорных удобрений [Третьякова, Балезина, 1978], положительно отзываясь даже на высокие дозы – до 120 кг/га д.в. P_2O_5 в форме суперфосфата.

Действие азотных минеральных удобрений на цианобактерии более сложно. Оно отлично при несистематическом и регулярном длительном применении азотных удобрений. При разовом внесении небольшие дозы минерального азота (40–60 кг/га) могут стимулировать размножение цианобактерий [Панкратова, 1982]. В то же время, как показала Л.И. Домрачева [Панкратова и др., 1984], используя для исследований 12-летний стационарный опыт, заложенный в НИИСХ Северо-Востока, регулярное внесение даже небольших доз аммиачной селитры угнетает размножение цианобактерий, а при дозе азота 180 кг/га оно полностью выпадают на поверхности пленок. Ниже приведены результаты этих опытов.

Вариант опыта	Численность, тыс. кл/см ²
Контроль (без удобрений)	254,0
$P_{120}K_{120}$ (фон)	629,0
Фон + N_{60}	94,5
Фон + N_{120}	57,5
Фон + N_{180}	0

Под влиянием азотных удобрений изменяется и азотфикссирующая активность. Сотрудником нашей лаборатории Е.Н. Резником [Панкратова и др., 1984] в опыте, заложенном по схеме полевого опыта (табл. 3) в лабораторных условиях, было показано, что наивысшая нитрогеназная активность у *N. muscorum* (при его предварительной инокуляции в почву) была в варианте, где вносились только фосфорно-калийные удобрения (фон). При внесении по фону азотных удобрений она неизменно снижалась (рис. 1). Через сутки после внесения аммиачной селитры даже небольшая доза минерального азота (30 кг/га) ингибирала азотфикссию. При дозе 60 кг/га она исчезала. Однако по мере увеличения времени от срока внесения азотных удобрений нитрогеназная активность возрастала и через месяц она регистрировалась даже при высоких дозах азота.

Ингибирующее действие азотных удобрений на азотфикссию, как показали опыты на Ротамстедской опытной станции, продолжается долго. Азот, внесенный в марте в дозе 80 кг/га под посевы пшеницы, почва под которой была инокулирована *N. elipsosporum*, ингибирал азотфикссию до августа (рис. 2). Однако он стимулировал ее позже, когда большая часть внесенного азота использовалась растением или терялась из почвы.

Таким образом, эффективное функционирование цианобактерий как азотфикссиаторов можно ожидать на пахотных почвах при внесении небольших доз минерального азота или в конце вегетации высших растений, когда использован основной запас легкодоступного азота в почве.

Влияние пестицидов. Так как в настоящее время в сельском хозяйстве применяется около 900 химических соединений и около 60 тыс. композиций, используемых в качестве инсектицидов, гербицидов, пестицидов и регуляторов роста растений, то вряд ли возможно предполагать их единообразное действие на цианобактерии. Действительно, сообщается, что они могут влиять на рост и азотфикссию, обладать мутагенным эффектом, могут накапливаться в клетках, а также подвергаться в них детоксикации [Круглов, 1984; Chinnaswamy, Patel, 1984].

Более всего изучено влияние на цианобактерии гербицидов. Цианобактерии, обладая фотосинтезом, близким по механизму к высшим хлорофиллюносым растениям, очень чувствительны к различным гербицидам. Они избирательно реагируют на них, изменяя численность клеток в почве и видовой состав. Большинство гербицидов угнетает цианобактерии. Так, через неделю после обработки атразином, монуроном и карбатионом исчезли из состава почвенного микробоценоза *N. punctiforme*, *Anabaena* sp., *A. cylindrica* [Круглов, 1984]. Восстановление видовой структуры происходило медленно и зависело от стабильности препарата. При многолетнем применении этих препаратов азотфикссирующие цианобактерии "выбрасываются" из микробоценоза. В то же время эптом был, по-видимому, менее токсичен для цианобактерий. Избирательная и повышенная чувствитель-

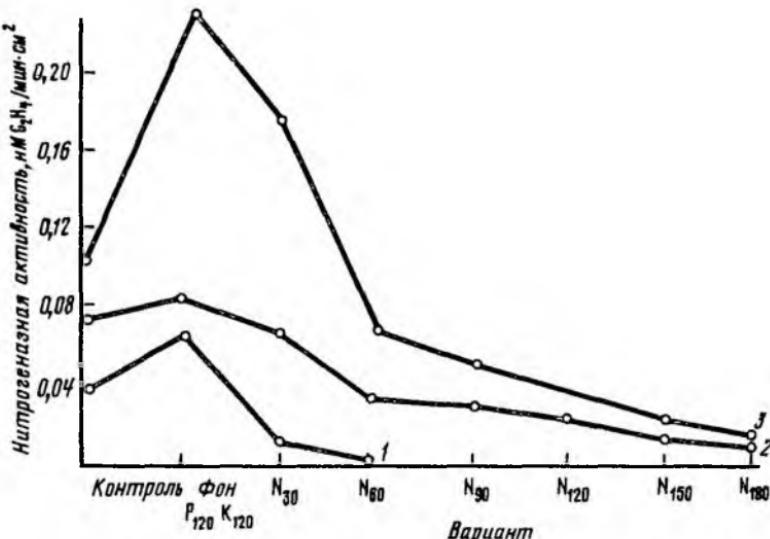


Рис. 1. Влияние удобрений на нитрогеназную активность. *N. muscogae*
Удобрения внесены 12.06; 1 – проба 13.06; 2 – проба 28.06; 3 – проба 14.07

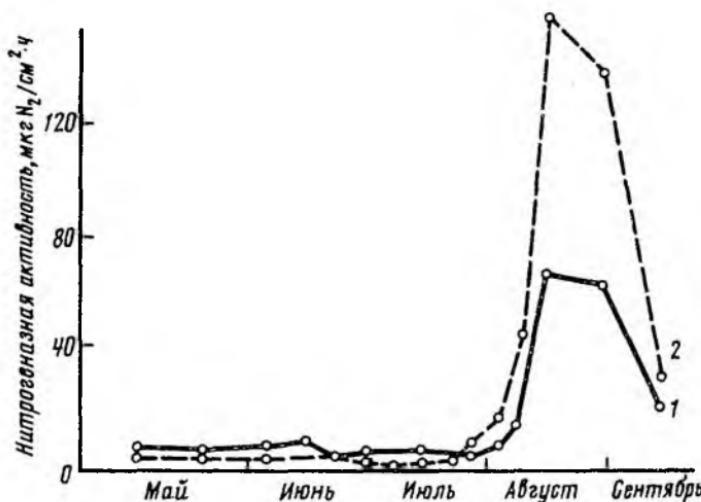


Рис. 2. Влияние азотных удобрений на нитрогеназную активность на участках, инокулированных *N. elipsosporum* по: [Witty et al., 1979]
1 – контроль; 2 – внесено 80 кг N/га

нность цианобактерий к гербицидам дает возможность, с одной стороны, побирать наименее токсичные для них гербициды, в другой – использовать цианобактерий для разработки метода экспресс-микроскрининга природных соединений и продуктов искусственного синтеза – ингибиторов фотосинтеза [Круглов, 1984].

В заключение необходимо отметить, что в результате сельскохозяйственного использования почв экологические факторы в них чрезвычайно

разнообразны и сложны. От изменения их интенсивности зависят все типы жизненных условий: свет, аэрация, влажность и температура почвы, pH почвенного раствора, обеспечение минеральными элементами, концентрация пестицидов и т.д. Таким образом, существует множество переходных ситуаций, имеющих экологический характер. Изучение их и выбор оптимального режима для биологической активности в агросистемах интенсивного использования предусматривает возможность учета всех ингредиентов естественного почвенного плодородия, в том числе и цианобактерий — накопителей азота в почвах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Дарт П.Дж., Дэй Дж.М. Несимбиотическая фиксация азота в почве // Почвенная микробиология. М.: Колос, 1979. С. 275–306.

Домрачева Л.И. Почвенные водоросли как продуценты органического вещества и их значение в трофических связях почвенных организмов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1974. 30 с.

Домрачева Л.И., Лебедева О.В., Кожевин П.А. Особенности альгобактериального комплекса при "цветении" почвы // Вестн. МГУ. Сер. 17, Почвоведение. 1986. № 3. С. 38–43.

Домрачева Л.И., Штина Э.А. Структура группировок водорослей при "цветении" почвы // Ботан. журн. 1985. Т. 70, № 2. С. 180–187.

Круглов Ю.В. Микробиологические аспекты применения гербицидов в сельском хозяйстве: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1984. 45 с.

Мезенцева Г.В. Пути преобразования органического вещества синезеленых азотфикссирующих водорослей (цианобактерий) в почве // Научные основы повышения плодородия почв. Пермь: Перм. с.-х. ин-т, 1982. С. 107–113.

Носкова Т.С. Сезонные изменения флоры водорослей в некоторых почвах Кировской области // Ботан. журн. 1968. Т. 53, № 7. С. 983–987.

Панкратова Е.М. Динамика накопления азота водорослями на пойменных почвах умеренной дозы // Биодинамика и плодородие почвы. Таллин: Изд-во АН ЭССР, 1979. С. 143–146.

Панкратова Е.М. Азотфикссирующие синезеленые водоросли (цианобактерий) в накоплении азота и повышении плодородия почвы: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1981. 39 с.

Панкратова Е.М. Размеры азотфикссирующей деятельности синезеленых водорослей (цианобактерий) в зависимости от внесения азотных удобрений // Экологические последствия применения агрохимикатов (удобрения). Пущино, 1982. С. 34–35.

Панкратова Е.М. Участие синезеленых водорослей в азотном балансе почв // Минеральный и биологический азот в земледелии СССР. М.: Наука, 1985. С. 221–228.

Панкратова Е.М. Участие цианобактерий в круговороте азота в почве и создании ее плодородия // Успехи микробиологии. 1987. Вып. 21. С. 212–242.

Панкратова Е.М., Домрачева Л.И., Маркова Г.И. и др. Биологическая оценка состояния почвы при разных дозах азотных удобрений // Эффективность удобрений и окультуривание почв северо-востока Нечерноземной зоны РСФСР. Киров, 1984. С. 111–113.

Панкратова Е.М., Мезенцева Г.В. Деструкция клеток синезеленых водорослей в почве // Биол. науки. 1985а. № 3. С. 95–100.

Панкратова Е.М., Мезенцева Г.В. Значение синезеленых водорослей (цианобактерий) в круговороте азота в почвах умеренной зоны // Бюл. ВНИИСельхозмикробиологии. 1985б. № 42. С. 48–51.

Перминова Г.Н., Кабиров Р.Р., Киприянов В.М. Водоросли как продуценты тундровых биогеоценозов // Споровые растения тундровых биогеоценозов. Сыктывкар. Кomi Фил. АН СССР, 1982. С. 81–94.

Помелова Г.И. Сезонная динамика почвенных водорослей в полях севооборота // Ботан. журн. 1971. Т. 56, № 1. С. 126–133.

Третьякова А.Н., Балезина Л.С. Реакция почвенных водорослей на вносимые в

почву удобрения // Почвы и приемы повышения эффективности их использования в условиях Кировской области. Пермь, 1978. С. 45–51.

Третьякова А.Н., Балезина Л.С. Влияние известкования на распространение водорослей в почве // Вопросы повышения плодородия почв и урожайности сельскохозяйственных культур Кировской области. Пермь, 1981. С. 148–161.

Штина Э.А. Почвенные водоросли пшеничного поля // Биоценоз пшеничного поля. М.: Наука, 1986. С. 127–138.

Штина Э.А., Голлербах М.М. Экология почвенных водорослей. М.: Наука, 1976. 144 с.

Chinnaswamy R., Patel R.J. Blue-green algae and pesticides // Pesticides. 1984. Vol. 18, N 9. P. 5–8.

Cole N.A. Blue-green algae a fertilizer? Crops and Soils Mag. 1977. Vol. 30, N 3. P. 7–10.

Henriksson E., Henriksson L.E., da Silva E.J.A. Comparisson of nitrogen fixation by algae of temperate and tropical soils // Nitrogen fixation by free-living microorganism / Ed. W.D. Stewart. Cambridge, 1975. P. 199–206.

Jahnke E. Die Wolle Stickstoffbinden der Blaualgen in mecklenburgischen Boden // Zentr.-Bl. Bacteriol., Parasitenk., Infektionskrankh. und Hyg. Abt. 2. 1967. Bd. 121, N 6. S. 636–643.

Nekrasova K.A., Koslovskaja L.S., Domraceva L.I., Stina E.A. The influence of invertebrates on the development of algae // Pedobiologia. 1976. Bd. 16, N 4. S. 286–297.

Shimmel S., Darley W.M. Productivity and density of soil algae in an agricultural system // Ecology. 1985. Vol. 66, N 5. P. 1439–1445.

Verma L., Martin J.P. Decomposition of algal cells and components and their stabilization through complexing with model humic acid-type phenolic polymers // Soil Biol. and Biochem. 1976. Vol. 8, N 2. P. 85–90.

Witty J.F. Algal nitrogen fixation on temperate arable fields // Plant and Soil. 1979. Vol. 52, N 2. P. 165–173.

Witty J.F., Keay P.J., Frogatt P.J., Dart P.J. Algal nitrogen fixation on temperate arable fields. The Broadbalk experiment // Ibid. 1979. Vol. 52, N 2. P. 151–164.

УДК 631.46

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИЗОТОПА ^{15}N ПРИ ИЗУЧЕНИИ НЕСИМБИОТИЧЕСКОЙ АЗОТФИКАЦИИ

Т.А. Калининская, Ю.М. Миллер

Институт микробиологии АН СССР, Москва

Одним из первых биохимических процессов, при изучении которого использовался стабильный изотоп ^{15}N , была его биологическая фиксация. Было показано, что $^{15}\text{N}_2$ не участвовал в обменных реакциях, и, таким образом, ассимиляция $^{15}\text{N}_2$ клетками микроорганизмов или тканями растений служила строгим доказательством наличия азотфиксации. В опытах с азотобактером было обнаружено, что скорость ассимиляции молекул $^{15}\text{N}_2$ не отличалась от скорости усвоения $^{14}\text{N}_2$, вследствие чего изотопный азот позволил дать точную количественную оценку процесса азотфиксации [Burris, Wilson, 1945; Вильсон, 1954].

Соотношение изотопов азота ^{14}N и ^{15}N в большинстве природных объектов, в том числе и в азоте атмосферы, равняется $272 \pm 0,3 : 1$, и, таким образом, процентное содержание атомов ^{15}N составляет $0,3663 \pm \pm 0,0004\%$ [Danso, 1985].

Для определения азотфиксации исследуемые объекты помещают в атмосферу, содержащую молекулярный азот, обогащенный $^{15}\text{N}_2$. После окончания эксперимента азот образца переводят в аммонийную форму по методу Кельдаля. Количественный анализ процентного содержания изотопов азота в исследуемом материале проводится масс-спектрометрически после окисления аммиака до молекулярного азота. Ассимиляция $^{15}\text{N}_2$ определяется по увеличению процентного содержания массы ^{15}N по сравнению с ее природной величиной. Эта величина, вычисляемая как разница между процентом ^{15}N в образце и величиной его природного содержания, обозначается как избыток атом.% ^{15}N , или обогащение [Барнард, 1957].

Использование масс-спектрометрической техники позволяет проводить определение содержания ^{15}N с большой точностью и улавливать различия в количестве ^{15}N , содержащемся в образце, порядка 0,001–0,002 избытка атом.% изотопа ^{15}N . Превышение содержания ^{15}N в образце на 0,010–0,020 атом.% по сравнению с природным рассматривается как достоверное доказательство наличия азотфиксации в исследуемых объектах [Вильсон, 1954].

Расчет количества фиксированного азота в образце приводится в соответствии с уравнением

$$\text{фиксированный азот, мг} = \frac{\text{общий азот (мг)} \times \text{избыток атом.}%^{15}\text{N}}{\text{избыток атом.}%^{15}\text{N в N}_2}.$$

В течение более 25 лет изотопный метод оставался ведущим при проведении исследований в области азотфиксации. С его помощью был уточнен круг микроорганизмов, способных к азотфиксации. Он позволил с достоверностью установить наличие даже незначительной азотфикссирующей активности у исследуемых микроорганизмов. Так, благодаря использованию изотопного метода была впервые доказана способность к азотфиксации у анаэробных фотосинтезирующих бактерий [Катеп, Gest, 1949]. Эти работы опровергли бытовавшее до того представление, что круг свободноживущих азотфиксаторов ограничен микроорганизмами родов *Azotobacter* и *Clostridium* и синезелеными водорослями [Виноградский, 1952].

В нашей стране изотопный азот широко использовался при изучении азотфиксации у олигонитрофильных микроорганизмов, являющихся сравнительно малоактивными азотфиксаторами. Было подтверждено наличие азотфикссирующей активности у представителей родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium* и др., и в то же время показано, что целый ряд олигонитрофилов, дающих рост на агаризованных безазотных средах, не обладает способностью к азотфиксации [Клевенская, 1974; Мальцева, Изжеурова, 1968].

В настоящее время определение азотфикссирующей способности микроорганизмов производится в основном ацетиленовым методом. Его преимущество заключается в чрезвычайно высокой чувствительности, так он в 1000 раз превосходит изотопный метод. Проведение анализов производится быстро и не требует сложного оборудования [Hardy et al., 1973].

Однако ацетиленовый метод является косвенным, основанным на восстановлении нитрогеназой неприродного субстрата, и имеет ряд ограничений, которые становятся особенно заметными в тех случаях, когда необходимо получить точные количественные данные о размерах азотфиксации.

Отмечено варьирование величин коэффициентов, определяющих соотношение молекулярного азота и восстановленного ацетилена у различных азотфикссирующих объектов.

Ацетилен является ингибитором нитрификации, денитрификации и процессов образования и окисления метана. В связи с последним обстоятельством фиксация азота как чистыми культурами метанокисляющих бактерий [Романовская и др., 1980], так и в почве при использовании метана в качестве источника энергии [Чистякова и др., 1982] может быть определена только изотопным методом. Таким образом, широкое использование ацетиленового метода не снимает значимости изотопного метода как единственного прямого и физиологически адекватного метода исследования процесса азотфиксации.

Необходимость точной количественной оценки активности азотфиксации под бобовыми и небобовыми культурами, используемыми в сельскохозяйственном производстве, привлекает в настоящее время все большее внимание к разработке и использованию изотопных методов, способных выполнить эту задачу с наибольшей точностью.

Определение азотфиксации в системе почва—растение путем инкубации растущих бобовых или небобовых растений в атмосфере, содержащей обогащенный изотопом молекулярный азот, проводится редко из-за высокой стоимости изотопа и трудностей, связанных с длительным поддержанием в замкнутых камерах, где выращиваются растения, условий, оптимальных для их роста. Обычно такие опыты проводят в лабораторных условиях. Продолжительность их не превышает нескольких суток, поэтому они не могут выявить вклад биологического азота в питание растений на всем протяжении вегетации.

Основной способ количественной оценки объема азотфиксации в настоящее время — это метод изотопного разбавления, суть которого заключается в том, что в качестве азотного питания растения получают связанные соединения азота, обогащенные ^{15}N . Если растения используют только связанный азот, то процентное содержание в них изотопа не будет отличаться от того, какое имелось в источнике связанного азота. Если же в результате деятельности азотфикссирующих микроорганизмов для растений окажется доступным и азот атмосферы, то процентное содержание в них ^{15}N будет уменьшаться благодаря разбавлению за счет $^{14}\text{N}_2$, фиксированного из воздуха. Чем выше активность азотфиксации, тем сильнее будет разбавление в растениях исходной метки ^{15}N . Доля биологического азота в питании растений может быть рассчитана по уравнению

$$\text{азот, фиксированный} = \frac{\text{избыток атом.}\% \text{ }^{15}\text{N в растениях}}{\text{избыток атом.}\% \text{ }^{15}\text{N в удобрениях}} \cdot \text{из воздуха, \%}$$

Метод изотопного разбавления дает наиболее четкие результаты в тех случаях, когда растения выращиваются в песчаных или водных культурах, где единственным источником азота являются минеральные удобрения,

Таблица 1

Использование рисом разных источников азота при развитии в песчаной культуре

Вариант	Избыток ^{15}N в растениях, атом.%	Общий азот растения без азота семян	Азот, усвоенный из удобрений, мг на сосуд	Азот, усвоенный из воздуха	
				мг на сосуд	в % от общего содержания азота в растениях
Контроль без внесения азотных удобрений	0,00	1,85	0,00	1,85	64,91
Внесено 14 мг/кг NH_4^+/N , содержащего $7,74$ избытка атомов. % ^{15}N	6,230 (стебли); 5,470 (корни)	13,08	10,98	2,1	14,91
Внесено 14 мг/кг NO_3^-/N , содержащего $5,087$ избытка атом. % ^{15}N	3,633	6,82	4,88	1,91	24,8
Внесено 56 мг/кг NO_3^-/N , содержащего $5,087$ избытка атом. % ^{15}N	4,048	11,27	8,89	2,388	19,18

содержащие изотопный азот. При проведении подобных опытов было показано, что растения кукурузы содержали 12,6% азота, поступившего из атмосферы. Вклад биологического азота в питание пшеницы колеблется от 10 до 23%, а у растений мятыника составлял 33,8% [Rennie R. Rennie D., 1983].

Метод изотопного разбавления был использован нами в опытах по определению активности азотфиксации у растений риса, выращенных в присутствии разных источников азотного питания.

Растения риса сорта Кубань-3 выращивали на среде Прянишникова в сосудах, содержащих 1 кг промытого и прокаленного песка без внесения азота и с внесением $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ и $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$. Опыты проводили в течение 60 дней в условиях оранжереи. 10-дневные проростки были инокулированы азоспиреллой, выделенной с корнем риса. Расчет использования растениями разных форм азота проводили по формуле изотопного разбавления с учетом количества азота, содержащегося в семенах. Полученные данные представлены в табл. 1.

Уменьшение процента изотопа в растениях по сравнению с его содержанием в удобрениях свидетельствовало о наличии азотфиксации и об усвоении растениями азота, фиксированного в ризосфере. Наличие азотфиксации в этом опыте было обнаружено и с помощью ацетиленового метода. По нашим данным, в присутствии аммиачного азота растения усваивали из воздуха 14,9% содержащегося в них азота, а в присутствии разных доз нитратов – от 19,4 до 24,8%.

Использование метода изотопного разбавления для количественных расчетов усложняется в том случае, когда содержащие ^{15}N удобрения вносятся в почву. В этом случае разбавление метки ^{15}N будет происходить в результате усвоения как молекулярного, так и почвенного азота. Для

количественной оценки вклада молекулярного азота в питание растений, выращенных в условиях почвы, необходимо сравнение получаемых показателей с величинами, обнаруживаемыми у нефикссирующих азот растений, выращенных в тех же условиях.

Количественную оценку участия биологического азота в питании растений можно получить, проводя опыты с почвой, обогащенной ^{15}N . Для этой цели используют почву, содержащую повышенные концентрации изотопа после проведения опытов с азотными удобрениями, или предварительно вносят в почву растительные остатки, содержащие изотоп, или вносят меченный азот одновременно с добавкой органических материалов [Rennie R., Rennie D., 1983]. Для получения более точных количественных данных рекомендуют проводить сравнение содержания изотопа в растениях с процентом ^{15}N не в валовом азоте почвы, а в легкоусвояемых минеральных фракциях [Chalk et al., 1983].

Интересным вариантом этого метода является работа на уровне природных обогащений азота. При метаболизме в почве нитратного азота происходят потери более легкого изотопа ^{14}N , в результате чего почва обычно содержит более высокий процент ^{15}N , чем воздух. Выявление уменьшения содержания ^{15}N в растениях по сравнению с почвой свидетельствует об ассимиляции ими молекулярного азота в результате деятельности симбиотических или ассоциативных азотфиксаторов. При этом отпадает необходимость использовать соединения, содержащие изотопный азот. Применение этого метода ограничено необходимостью проводить анализы на специальных масс-спектрометрах, обладающих высокой чувствительностью, а также тем обстоятельством, что достоверные результаты могут быть получены лишь при сравнительно высоких уровнях азотфиксации.

Использование изотопного азота дает уникальную возможность проследить за судьбой азота, фиксированного в почве несимбиотическими азотфиксаторами, определить скорость его минерализации, гумификации, а также исследовать скорость его усвоения растениями.

Нами была проведена серия исследований, позволившая получить ответы на некоторые из этих вопросов.

Обогащение почвы изотопным азотом за счет деятельности несимбиотических азотфиксаторов проводили путем ее инкубации в атмосфере, обогащенной $^{15}\text{N}_2$. Для усиления активности несимбиотических азотфиксаторов в почву вносили 0,5–1,0% соломы, целлюлозы или глюкозы. Продолжительность инкубации в атмосфере $^{15}\text{N}_2$ равнялась 3–4 нед. Почвенные образцы, обогащенные изотопным азотом, использовали для выделения разных фракций азотсодержащих соединений, а также для выращивания растений.

Исследования показали, что превращения в почве азота, фиксированного несимбиотическими микроорганизмами в почвах разного типа (дерново-подзолистых, серых лесных, черноземных и каштановых), протекали в значительной степени однотипно. Фиксированный микроорганизмами азот примерно поровну распределялся между устойчивыми и лабильными фракциями азотсодержащих веществ почвы [Калининская и др., 1979]. Значительная часть фиксированного микроорганизмами азота подвергалась быстрой минерализации. Так, в черноземной и лугово-черноземовидной почве после двухнедельной инкубации в минеральную форму перешло

Таблица 2

Включение азота, фиксированного микроорганизмами, в состав фульвокислот и гуминовых кислот

Почва	Молекулярный азот, % от исходного содержания азота		
	валовой азот почвы	фульвокислоты	гуминовые кислоты
Лугово-болотная (Кзыл-Ординская область)	19,5	4,14	12,1
Лугово-черноземовидная (Краснодарский край)	5,7	2,54	4,9
Чернозем обыкновенный (Молдавская ССР)	3,2	3,76	3,76

около 17%, а в лугово-болотной почве под рисом около 28% фиксированного микроорганизмами азота. В черноземных почвах во фракции легко гидролизуемого азота обнаруживалось около 27% ^{15}N , содержавшегося в почве, в лугово-болотной почве — 19,7%. В трудногидролизуемых фракциях связывалось от 52 до 56% биологического азота. Азот, фиксированный микроорганизмами, быстро включался в состав почвенного гумуса. Процентное содержание изотопного азота в гуминовых кислотах было близким к его содержанию в общем азоте почвы (табл. 2).

Большой интерес представляло установление скорости усвоения растениями азота, фиксированного в почве несимбиотическими микроорганизмами. Доступность биологического азота для растений определялась при выращивании их в почве, обогащенной ^{15}N в результате азотфикссирующей деятельности бактерий. За 30–60 дней вегетации овес усвоил 11,4% содержащегося в почве биологического азота, пшеница — 12,7%, кукуруза — от 6,4 до 10,4%. За два вегетационных сезона усвоение растениями биологического азота в условиях незатопленных почв колебалось от 15 до 24%.

Более быстрые темпы ассимиляции биологического азота были обнаружены у растений риса, развивающихся в условиях затопления. Полученные данные представлены в табл. 3. В течение первого года вегетации рис мог ассимилировать до 30% азота, фиксированного несимбиотическими микроорганизмами. Более низкая скорость усвоения "биологического азота" наблюдалась при выращивании риса в почвах с низким содержанием гумуса и азота и с неблагоприятными физико-химическими характеристиками (например, с высоким содержанием солей или щелочным рН). Внесение в почву азотных удобрений заметно усиливало ассимиляцию растениями биологического азота. Основной вынос биологического азота осуществлялся рисом в течение первого года. Наблюдения за процентным содержанием ^{15}N в почве показали, что к концу второго вегетационного сезона оно стабилизировалось на уровне, составлявшем около 50% от исходного содержания, и в дальнейшем существенно не изменялось [Калининская с соавт., 1979].

В одном из опытов, проводившихся на лугово-черноземовидной почве, динамика выноса растениями ^{15}N из почвы исследовалась в течение 5 лет. Для стимуляции деятельности несимбиотических азотфиксаторов в почву

Таблица 3

Использование рисом ^{15}N , фиксированного почвенными бактериями

Почва	Удобрение	Усвоение рисом ^{15}N , % к исходному содержанию в почве		
		1-й год	2-й год	Сумма за 2 года
Лугово-черноземовидная	PK	28,0	3,6	31,6
Лугово-болотная	PK	26,8	5,2	32,0
Темно-каштановая	PK	16,3	6,1	22,4
	NPK	30,2	4,8	35,0
Такыровидная				
незасоленная	NPK	20,4	4,0	24,4
засоленная	PK	8,4	7,0	15,4
	NPK	14,1	6,1	20,2

вносились солома. В первый год рис выращивали без внесения удобрений, во второй год опыты ставили с внесением NPK, в последующие годы с внесением только фосфорных и калийных удобрений. В первый год рис усваивал 19,0% ^{15}N , содержавшегося в почве, во второй — 8,2%, в 3, 4 и 5-й годы — соответственно 3,4, 1,9 и 2,2% от исходного содержания изотопного азота в почве. За 5 лет наблюдений растения использовали 34,7% азота, фиксированного несимбиотическими бактериями, 57% изотопа закрепилось в почве и неучтенные потери составляли 8,3%.

Представляло интерес сравнить скорость усвоения растениями азота, фиксированного разными видами азотфикссирующих микроорганизмов. Для этой цели стерильную почву, в которую вносили глюкозу или лактат, инокулировали разными видами микроорганизмов и инкубировали в присутствии $^{15}\text{N}_2$. Обогащенную изотопом почву использовали для выращивания риса. Одновременно с посевом растений в почву вносили суспензию нестерильной почвы для восстановления нормального состава микробного ценоза почвы. В этом опыте была прослежена динамика усвоения изотопа на ранних стадиях развития растений. Полученные данные представлены в табл. 4. Проведенные опыты показали, что рис одинаково легко ассимилировал азот, фиксированный разными видами микроорганизмов. Усвоение рисом биологического азота происходило очень быстрыми темпами и через 10 дней могло достигать 12–13% от исходного содержания изотопа в почве.

Таким образом, исследования, проведенные с помощью изотопного азота, показали, что значительная часть азота, фиксированного несимбиотическими микроорганизмами, подвергается быстрой минерализации и может быть ассимилирована растениями или теряется в процессах денитрификации. Около 50% биологического азота прочно закрепляется в составе почвенного гумуса и способствует стабилизации азотного баланса почвы.

Высокая степень усвоения рисом азота, фиксированного несимбиотическими азотфиксаторами, свидетельствует о том, что процессы азотфиксации в почвах под рисом не только содействуют поддержанию потенциального плодородия почв, но и должны оказывать непосредственное влияние на урожай растений.

Таблица 4

Усвоение рисом азота, фиксированного разными видами микроорганизмов

Азотфикссирующие микроорганизмы	Вынос ^{15}N за период, % от исходного содержания в почве				
	0–10 дней	11–12 дней	21–60 дней	В сумме за 60 дней	В сумме за 2 сезона
<i>Azotobacter chro-</i> <i>ococcum</i>	12,67	12,43	8,13	33,23	36,5
<i>Clostridium pasteu-</i> <i>riani</i>	13,4	8,74	5,00	27,2	30,7
<i>Azospirillum brasi-</i> <i>lense</i>	12,23	2,92	12,45	27,5	38,2
<i>Xanthobacter flavus</i>	4,23	6,75	7,26	18,2	30,74

Таблица 5

Активность азотфиксации в зональных почвах СССР, определенная при помощи изотопного метода

Зона	Тип почвы, угодья	Фиксация азота, мг на 1 кг почвы за 1 мес.
Коми АССР, г. Воркута	Тундровая поверхность глеевая, тунд- ра	0,15
Коми АССР, г. Сыктыв- кар	Сильно-подзолистая, лес	0,49
Московская область	Дерново-подзолистая, лес Дерново-подзолистая, пашня	1,52 0,4–0,6
	Серая лесная, лес Серая лесная, пашня	0,73 0,577
Воронежская область	Мощный чернозем, степь	1,65
Молдавская ССР	Чернозем обыкновенный, залежь	2,2
Казахская ССР, Алма- Атинская область	Темно-каштановая, залежь	7,1
	Каштановая, пашня	0,29
Узбекская ССР, Ташкент- ская область	Светлый серозем, пашня	0,89
	Типичный серозем, целина	1,44
	Типичный серозем, хлопчатник	1,69
	Типичный серозем с внесением органи- ческих удобрений	11,5

Нами была проведена серия исследований с зональными почвами Советского Союза, в которых определяли активность азотфиксации по включению тяжелого изотопа азота из газа $^{15}\text{N}_2$ в почвенные образцы по описанной ранее методике [Калининская, 1971]. Полученные данные представлены в табл. 5.

В ходе проведенных исследований были выявлены различия в азотфикссирующей активности почв разного типа. При исследовании почв в естественном состоянии максимальная азотфиксация обнаружена в почвах, характеризующихся оптимальными физико-химическими условиями

(близкой к нейтральной реакцией среды, благоприятной структурой, отсутствием засоления) и обладающих большими запасами органических веществ, доступных для использования почвенными микроорганизмами. К таким почвам относятся целинные черноземные и каштановые почвы, а также луговые почвы нечерноземной зоны. В пахотных почвах фиксация азота без внесения свежих органических веществ извне в большинстве случаев протекает довольно слабо. В первую очередь это касается пахотных почв дерново-подзолистой зоны, серых лесных почв и иногда даже пахотных черноземных и каштановых почв. Высокая активность азотфиксации была выявлена в сероземных почвах Ташкентской области как целинных, так и пахотных. Особенно высокая активность азотфиксации была обнаружена в сероземных почвах, в которые вносились органические удобрения.

Проведя несколько условный пересчет активности азотфиксации на один гектар пахотного слоя, мы увидим, что в подзолистых и дерново-подзолистых почвах активность азотфиксации за счет органического вещества почвы не превышала 0,5–1,5 кг азота/га за месяц, в черноземах она могла достигать 5–6 кг/га, в сероземах – 4–5 кг/га.

При определении потенциальной активности азотфиксации, определяемой при внесении в почву органических добавок, выявлено четкое нарастание продуктивности азотфиксации при переходе от северных к южным почвам и в окультуренных почвах по сравнению с целинными.

Высокая потенциальная азотфикссирующая активность окультуренных почв свидетельствует о возможностях улучшения их азотного баланса за счет деятельности азотфиксаторов при внесении в них органических удобрений и растительных остатков, а также экзосмоса органических соединений корневой системы.

Данные, приведенные в настоящей работе, свидетельствуют о широких возможностях использования изотопного азота при изучении азотфиксации, особенно в тех случаях, когда необходимо провести ее точную количественную оценку. Это относится как к непосредственному измерению азотфиксации в почве путем прямой инкубации в атмосфере $^{15}\text{N}_2$, так и к изучению азотфиксации в системе почва–растение с использованием метода изотопного разбавления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Барнард Д. Современная масс-спектрометрия. М.: Изд-во иностр. лит., 1957. 415 с.

Вильсон П. Биологическая фиксация азота // Физиология бактерий. М.: Изд-во иностр. лит., 1954. С. 363–391.

Виноградский С.Н. Микробиология почвы (проблемы и методы). М.: Изд-во АН СССР, 1952. 792 с.

Калининская Т.А. Использование $^{15}\text{N}_2$ для определения азотфикссирующей активности почвы // Микробиологические и биохимические методы исследования почв. Киев: Урожай, 1971. С. 176–180.

Калининская Т.А., Миллер Ю.М., Белов Ю.М. Изучение доступности для риса азота, усвоенного из воздуха азотфикссирующими микроорганизмами // Круговорот и баланс азота в системе почва–удобрение–растение–вода. М.: Наука, 1979. С. 44–49.

Клевенская И.Л. Олигонитрофильные микроорганизмы почв Западной Сибири. Новосибирск: Наука, 1974. 220 с.

Мальцева Н.Н., Изжеурова В.В. Азотфикссирующая активность олигонитрофильных бактерий // Микробиол. журн. 1968. Т. 30, № 1. С. 3–7.

Романовская В.А., Людиченко Е.С., Соколов И.Г., Малащенко Ю.М. Фиксация молекулярного азота метанокисляющими бактериями // Там же. 1980. Т. 42, № 6. С. 683–688.

Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация. М.: Изд-во МГУ, 1986. 132 с.

Чистякова И.К., Калининская Т.А., Миллер Ю.М. Метан как источник углерода и энергии для азотфикссирующих бактерий // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1982. № 3. С. 428–432.

Burris R.H., Wilson P.W. Biological nitrogen fixation // Annu. Rev. Biochem. 1945. Vol. 14. P. 685–708.

Chalk P.M., Douglas L.A., Buchanan S.A. Use of ^{15}N enrichment of soil mineralizable N as a reference for isotope dilution measurements of biologically fixed nitrogen // Canad. J. Microbiol. 1983. Vol. 29, N 8. P. 1046–1052.

Danso S.K.S. Methods for estimating biological nitrogen fixation // Biological nitrogen fixation in Africa. Nairobi: MIRCEN, 1985. P. 224–244.

Hardy R.W.F., Burns R.D., Holsten R.D. Application of the acetylene–ethylene assay for measurement of nitrogen fixation // Soil. Biol. and Biochem. 1973. Vol. 5, N 1. P. 47–81.

Kamen H.D., Gest H. Evidence for a nitrogenase system in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* // Science. 1949. Vol. 109, N 2840. P. 500–562.

Rennie R.J., Rennie D.A. Techniques for quantifying N_2 fixation in association with nonlegumes under field and greenhouse conditions // Canad. J. Microbiol. 1983. Vol. 29, N 8. P. 1022–1035.

III. ГЕНЕТИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ЭВОЛЮЦИОННО-ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АЗОТФИКСАЦИИ

УДК 633.31/37

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ МАКРОСИМБИОНТА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АЗОТФИКСАЦИИ

И.А. Тихонович

Всесоюзный научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии, Ленинград

Исследования взаимодействия бобовых культур и клубеньковых бактерий выявили целый ряд существенных моментов, касающихся взаимоотношений микроорганизмов и растений. По существу, работы этого направления открыли новую область исследований — молекулярно-генетические основы взаимоотношения про- и эукариотических организмов, необходимую для оптимизации или предотвращения контактов микроорганизмов и растений, а также создания новых систем, отличающихся повышенной эффективностью.

Наиболее существенным положением в исследованиях бобово-ризобиального симбиоза стало описание на молекулярном уровне взаимодействия генетических факторов, определяющих порядок формирования и функционирования симбиотического аппарата [Verma, Jong, 1983]. Это открыло возможности для конкретизации данных формального генетического анализа [Nutman, 1969], учитывая, что регуляция цепи событий, приводящих к установлению симбиоза, осуществляется не только на уровне взаимодействия продуктов генов бактерий, но и, возможно, путем прямой регуляции генной активности, на основе общих регуляторных элементов [Verma et al., 1983].

Наличие таких элементов позволяет предполагать, что взаимоотношения между бактериями и растениями — необходимое условие развития организмов. Следовательно, четкое понимание деталей этого процесса представляет собой огромный резерв повышения эффективности сельскохозяйственного производства.

В связи с тем, что генетические факторы взаимодействия представляют собой уникальную часть генома, чрезвычайно важно определить их количество, локализацию и принципы регуляции. Кроме того, именно знание детальной структуры симбиотических генов позволит также разработать основы селекции бобовых, а в дальнейшем и небобовых растений по оптимизации их взаимодействия с бактериальной микрофлорой.



Рис. 1. Генетические факторы бобовых растений, вовлеченные в процесс симбиотической азотфиксации

На базе ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии в течение нескольких лет ведутся работы по изучению роли генотипа макросимбионта в определении активности и эффективности симбиотической азотфиксации. В них используются как традиционные методы генетического анализа, так и современные молекулярно-генетические подходы.

Практическая цель всех этих работ заключается в повышении эффективности симбиотической, или вообще биологической, азотфиксации. Наиболее вероятно, что лимитируют азотфиксацию в почвах не отсутствие активных штаммов микроорганизмов, а главным образом экологические условия, препятствующие установлению эффективного симбиоза [Alexander, 1984]. Важнейший среди них — совместимость штаммов и растений, которая проявляется на самых разных уровнях. Поэтому именно за счет улучшения совместимости партнеров по симбиозу можно надеяться на практическое использование биологического азота в урожае культурных растений.

В самом общем виде все факторы высших растений, непосредственно вовлеченные в процесс симбиотической азотфиксации, можно разделить на две большие группы генов [Verma, Jong, 1983], активность одних индуцируется попаданием на корни ризобий или их продуктов, а активность других ингибитируется после инокуляции (рис. 1).

Но следует иметь в виду, что эффективный симбиоз невозможен без целого ряда факторов, которые, хотя и не вовлечены непосредственно в процесс формирования клубеньков, но в решающей степени влияют на его эффективность. Среди них можно назвать систему усвоения азота, процесс фотосинтеза и снабжение клубеньков его продуктами и др. Все эти группы генов должны находиться в поле зрения исследователей, ведущих работу по повышению эффективности симбиотической азотфиксации.

Рассмотрение возможностей использования факторов макросимбионта в селекции и перспективам их дальнейшего изучения и посвящена данная работа.

Один из важнейших этапов организации селекции по любому признаку — оценка внутривидовой изменчивости. Знание резервов симбиотической азотфиксации представляется необходимым не только в связи с

конкретными практическими задачами, но и для выбора моделей, позволяющих исследовать те или иные стороны симбиотической азотфиксации. В отношении гороха эта проблема наиболее актуальна, так как именно для этой культуры свойственна наименьшая отзывчивость на инокуляцию производственными штаммами клубеньковых бактерий.

Из всех способов оценки симбиотических свойств наиболее приемлем в самых различных модификациях метод Харди [Hardy et al., 1968], основное достоинство которого – возможность прижизненного отбора растений, различающихся по активности ключевого фермента азотфиксаций комплекса, с последующим выделением перспективных сортов или линий.

Исследования, проведенные во ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии и ВИРе, позволили выявить наличие значительной межпопуляционной изменчивости по нитрогеназной активности, числу клубеньков, другим признаком симбиоза [Макашева и др., 1985]. Результаты показывают, что активность нитрогеназы может изменяться в широких пределах. Как правило, наиболее высокие активности были обнаружены у малоокультуренных сортов или сортообразцов гороха, потенциал симбиоза которых в целом значительно выше. Выше активность нитрогеназы у форм кормового использования, ниже – у гороха овощного направления.

Среди изученных форм выделено несколько сортообразцов гороха из Афганистана, не образующих клубеньки при заражении ризобиями европейского происхождения. Использование этих форм имеет большое значение для повышения отзывчивости бобовых на инокуляцию производственными штаммами клубеноковых бактерий. Наиболее важна эта проблема для гороха, клевера и других культур, так как в почве имеется большое количество бактерий соответствующих видов. Конкуренция со стороны этих микроорганизмов значительно снижает эффект от инокуляции – если на сое прибавка от применения препарата в новых районах возделывания составляет в среднем 3–5 ц/га, то на горохе она редко превышает 1–1,5 ц/га, а в большинстве случаев вообще не удается выявить достоверное увеличение урожая [Кожемяков, Доросинский, 1981].

Наряду с получением все более конкурентоспособных штаммов весьма перспективно использование сортов, которые бы обладали способностью выбирать из почвы только производственные штаммы, обладающие достаточно высоким уровнем активности и эффективности. В результате исследований процесса заражения афганских горохов [Четкова, Тихонович, 1986] из почв Ленинградской области был выделен ряд штаммов, способных образовывать клубеньки на этих формах. Детальное исследование одного из них – штамма А-1 показало, что он не испытывает конкуренции ни со стороны клубеноковых бактерий, находящихся в почве, ни со стороны вносимых совместно производственных штаммов, неспособных заражать данный генотип гороха. По литературным данным, способность преодолевать устойчивость афганских горохов связана с наличием у штаммов дополнительной плазиды pRL5J1 [Gotz et al., 1985]. По предварительным данным, наши штаммы также несут дополнительную плазиду.

Таким образом, штаммы типа А-1 в сочетании с генами устойчивости растения обладают абсолютной конкурентоспособностью и обеспечивают высокоеэффективный симбиоз (табл. 1). Конкурентоспособность и высокая эффективность в отношении культивируемых сортов гороха выгодно отли-

Таблица 1

Эффективность штаммов A-1 и 250а на формах гороха афганского происхождения

Форма гороха	Масса сухого растения, г				Содержание азота в зеленой массе, % на сухое вещество	
	контроль без инокуляции	инокуляция штаммом 250 а	инокуляция штаммом A-1	контроль без инокуляции	инокуляция штаммом 250 а	инокуляция штаммом A-1
K-2150	0,44	0,41	0,86	1,91	1,36	2,77
K-6106	0,58	0,54	0,86	1,75	1,73	2,87
K-6559	0,47	0,55	0,77	1,67	1,98	2,34
K-3329	0,31	0,67	0,76	2,58	3,85	3,70

Примечание. Номера образцов даны по каталогу ВИР. K-2150, K-6106, K-6559 – формы гороха из Афганистана; K-3329 – сорт из Вологодской области.

чают штамм A-1 от ранее известных [Lie, 1978], выделенных из почв Ближнего Востока. Так, например, штамм TOM, вирулентный для афганских горохов, не может конкурировать за места инфекции на корнях и достаточно даже незначительного количества бактерий другого, невирулентного штамма, чтобы полностью предотвратить клубенькообразование [Winarno, Lie, 1979]. Вердимо, наличия факторов клубенькообразования у ризобий еще совершенно недостаточно для обеспечения конкурентоспособности. В этой связи перенос плазмид в процессе создания новых штаммов должен сочетаться с отбором на фоне определенных генотипов растений в условиях конкуренции со стороны спонтанной микрофлоры.

Параллельно с переносом плазмид представляется перспективным введение факторов устойчивости к местной микрофлоре во вновь создаваемые сорта растений с целью повышения совместимости макро- и микросимбионта. В этом случае следует иметь в виду, что признак устойчивости к заражению может иметь градации. Так, в случае полной несовместимости штамм не способен образовывать клубеньки на данной форме гороха, например, европейские штаммы не вызывают клубнеобразования у гороха из Афганистана. Однако может наблюдаться и частичное проявление этого признака – клубеньки образуются, но они неэффективны и нитрогеназной активности не наблюдается. Этот тип несовместимости обнаружен у некоторых горохов из Эфиопии (подвид *abyssinicum*) и Ближнего Востока (подвид *elatius*) и напоминает отношения, складывающиеся при инокуляции штаммами, выделенными из растений другого вида, но той же группы перекрестной инокуляции. Как афганские формы, так и подвиды *abyssinicum* и *elatius* являются дикими примитивными формами из центров происхождения этой культуры [Говоров, 1930; Lie et al., 1984]. В большинстве своем в этих центрах, изолированных друг от друга, происходила параллельная эволюция макро- и микросимбионта, что и привело, по-видимому, к образованию высокоспецифичных, комплементарных сочетаний растение– штамм.

Значение пространственной изоляции партнеров по симбиозу было изучено нами на горохе. В этом случае была проведена оценка около 150 сортов и форм гороха, происходящих из основных экологического-географи-

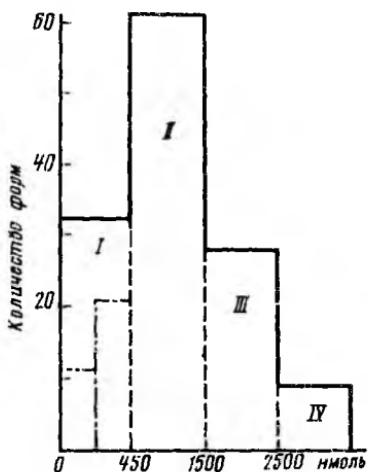


Рис. 2. Диаграмма распределения форм гороха по активности нитрогеназы

ческих – центров – Средиземноморского, Юго-Западно-Азиатского, Африканского, Восточно-Азиатского, Европейского. По результатам определения все формы разбиты на четыре класса, имеющие низкую (I, 0–450 нмоль), среднюю (II, 450–1500), высокую (III, 1500–2500) и очень высокую (IV, > 2500 нмоль) нитрогеназную активность (рис. 2).

Первый класс неоднороден по своему составу. Во-первых, это дикорастущие формы растений, не образующие клубеньков, произрастающие в горных районах Афганистана, и представители вида *Pisum fulvum*

из Израиля, которые, по данным [Lie et al., 1982], вообще не заражаются европейскими штаммами. Фенотип этих растений может быть обозначен Nod^- , fix^- . Во-вторых, формы, образующие зеленоватые и белые мелкие неэффективные клубеньки. Их фенотип характеризуется как Nod^+ , fix^- . Сюда относятся в основном зерновые и овощные сорта. И наконец, третья, самая интересная группа из класса с низкой активностью – это растения, образующие довольно хорошие, иногда даже многочисленные розовые клубеньки, но имеющие очень низкую азотфикссирующую активность.

Самый обширный второй класс составляют разные по происхождению и фенотипу растения, но все они имеют многочисленные розовые, хорошо развитые клубеньки.

Особый интерес в качестве селекционного материала для повышения симбиотической азотфиксации представляют формы с высокой и очень высокой нитрогеназной активностью. Это не только дикорастущие и кормовые формы, но и зерновые сорта, не утратившие в процессе селекции и введения в культуру способности к эффективной азотфиксации. Именно эти формы, обладающие ценными хозяйственными признаками и способные удовлетворять свои потребности в азоте за счет симбиотической азотфиксации, вероятно, наиболее перспективны и могут быть рекомендованы для селекции на повышение урожайности без использования минеральных удобрений.

На основании полученных данных была составлена карта распространения признака симбиотической азотфиксации (рис. 3). Можно выделить несколько центров селекции форм с высокой нитрогеназной активностью: Прибалтика, европейская часть СССР, Северная и Западная Европа. Важно отметить, что тестирование сортов производилось при инокуляции производственным штаммом 250а, выделенным по способности давать эффективный симбиоз со многими культивируемыми сортами, поэтому группировка высокоактивных форм в европейской части вполне закономерна. В Эфиопии и в Индии также отмечены формы с высокой нитрогеназной активностью (Африканский и Восточно-Азиатский центры происхождения

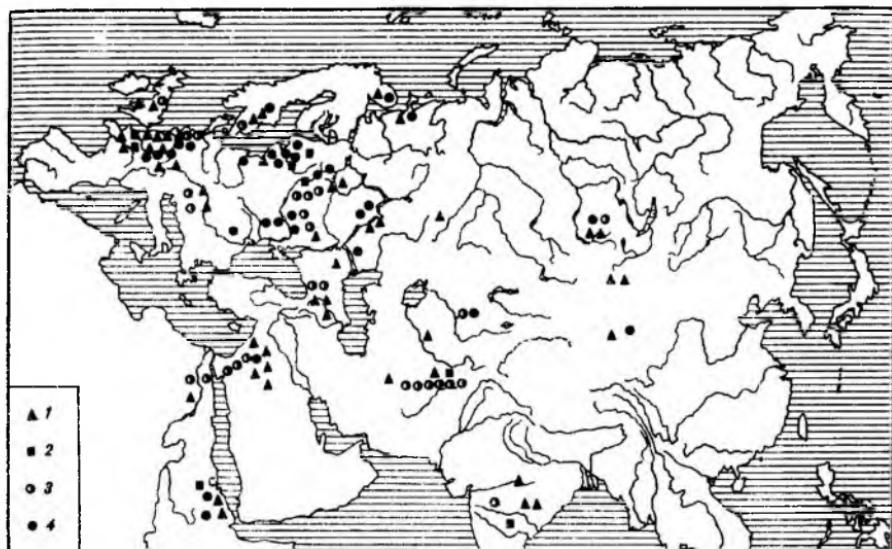


Рис. 3. Распространение признака активности симбиотической азотфиксации у форм гороха различного географического происхождения

1 – 0–450 нмоль, 2 – 450–1500, 3 – 1500–2500, 4 – 2500 нмоль

по Н.И. Вавилову). Это доказывает, что даже далеко стоящие по происхождению формы могут хорошо совмещаться и вступать в эффективный симбиоз с европейскими штаммами. Возможно, впрочем, что это результат длительного культивирования этих форм в условиях Северо-Запада. Кроме того, ясно определить и центры низкой активности – Ближний Восток и Афганистан, откуда происходят формы, несовместимые с европейскими штаммами, хотя вполне возможно, что потенциал азотфиксации этих сортов при заражении комплементарными штаммами весьма высок. Это, как уже указывалось, было отмечено при использовании штаммов, способных заражать афганские горохи. Исследования подобного рода указывают на необходимость постоянного контроля за показателями симбиотической азотфиксации в ходе селекции новых сортов [Симаров, Тихонович, 1985].

Обнаруженное разнообразие симбиотических характеристик у гороха позволяет исследовать целый ряд вопросов, касающихся как фундаментальных проблем симбиоза, так и практического использования этого разнообразия в селекции.

Создание основ селекции на повышение эффективности симбиотической азотфиксации требует четкого понимания влияния генотипа растения на факторы, ее определяющие. Среди таких факторов выделяют следующие: относительная эффективность азотфиксации, которая в первую очередь зависит от активности нитрогеназы и выделения водорода [Eisbrenner, Evans, 1983], корневое дыхание инокулированных растений [Mahon, 1979], эффективность расходования фотоассимилятов [Phillips, 1980] и, вероятно, ряд других. В качестве наиболее адекватного показателя эффективности азотфиксации можно рассматривать способность бобовых расте-

ний формировать полноценный урожай, используя фиксированный микроорганизмами азот атмосферы. Оценить значение всех этих признаков для селекции можно только с использованием адекватных моделей, основанных на сравнении исходного материала и выделенных из него линий, отличающихся по интенсивности и эффективности симбиотической азотфиксации.

В связи с этим нами была предпринята попытка выделения из различных сортов и форм гороха линий, контрастных по нитрогеназной активности [Берестецкий, Тихонович, 1985]. Выделение проводили при использовании ацетиленового метода, позволяющего определить активность азотфиксации без нарушения жизнеобитания с последующей закладкой линий. Отбор вели индивидуально как на повышение активности нитрогеназы, так и на снижение этого показателя. Селекция только по одному показателю симбиоза – нитрогеназной активности, измеренной ацетиленовым методом, оказалась весьма эффективной и в результате нескольких отборов удалось значительно изменить симбиотические характеристики по сравнению со средним уровнем исходной популяции [Тихонович и др., 1987].

На рис. 4 приведены результаты 4-летнего отбора по активности нитрогеназного комплекса, в ходе которого были выделены линии, значительно отличающиеся по активности от исходных популяций. Таким образом были созданы модели, позволяющие на сходных генетических фонах оценивать влияние повышения активности нитрогеназы на показатели эффективности симбиотической азотфиксации. Всего в течение двух сезонов было изучено 23 образца, из которых 10 представляли собой исходные сортовые популяции, а 13 – выделенные из них линии, различающиеся по нитрогеназной активности.

В стадии максимальной активности нитрогеназного комплекса, которая наблюдалась через 6 нед после посадки, выделенные линии достоверно отличались по ацетиленредуктазной активности от исходных сортов, что свидетельствует о результативности даже такого непродолжительного отбора по данному признаку. Выделение водорода, как оказалось, мало меняется под действием отбора, хотя можно отметить тенденцию к его увеличению при повышении нитрогеназной активности.

Вычисление коэффициентов корреляции для первых трех съемов у всех исследованных форм показало, что между выделением водорода и ацетиленредуктазной активностью наблюдалась положительная связь ($r = 0,66, 0,71$ и $0,91$ соответственно), причем она была наибольшей в стадии максимальной активности нитрогеназного комплекса. Сходные данные отмечены для гороха при исследовании 14 других сортов [Bedmar, Phillips, 1984].

Таким образом, выделение водорода и относительная эффективность мало меняются под действием отбора и, поскольку эти величины целиком определяются нитрогеназной активностью, они не могут служить показателями продуктивности симбиотических систем. Очевидно, что наиболее адекватно оценить влияние активности нитрогеназы на эффективность симбиоза можно только при сравнении урожайных данных.

В табл. 2 представлены данные по влиянию отбора на урожай и содержание азота в растениях при выращивании их на различных источниках азотного питания. Прежде всего следует отметить, что для всех исходных сортов сырья масса оказалась ниже при использовании биологического

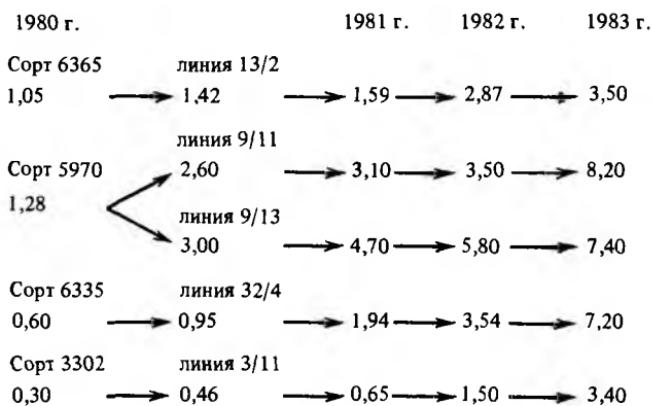


Рис. 4. Селекция гороха по активности нитрогеназы (мкмоль $C_2H_4/ч \cdot$ растение)

азота, чем при добавлении минеральных удобрений, процентное же содержание азота, напротив, было в большинстве случаев выше именно в условиях симбиоза. Такая ситуация, вероятно, связана с тем, что в процессе селекции новых сортов гороха на высоком фоне азотных удобрений способность растения за счет симбиотической азотфиксации значительно снижается. Важно подчеркнуть, что так вели себя сорта с совершенно различной активностью нитрогеназного комплекса.

В неспособности использовать биологический азот заключается, вероятно, одна из основных причин низкой отзывчивости гороха на нитрагинизацию в ряде регионов нашей страны [Кожемяков, Доросинский, 1981]. Подобные данные указывают на настоятельную необходимость организации селекции бобовых, и в первую очередь гороха, на повышение эффективности симбиотической азотфиксации. Наличие генетически родственных, контрастных по ацетиленовой редукции форм позволило оценить влияние отбора по данному признаку на урожай.

Хотя большинство из представленных в табл. 2 линий отличается повышенной активностью азотфиксации, только у четырех из них (9/13, 9/14, 32/4 и 3/11) вследствие отбора удалось получить превышение массы растений при выращивании без добавления минеральных азотных удобрений. Очень важно, на наш взгляд, отметить, что линия 3/11 имеет активность почти в два раза меньше, чем две другие перспективные линии — 9/13 и 32/3, а это означает, что в процессе селекции следует добиваться не абсолютного максимума активности нитрогеназы, а превышения данного показателя над средним для сорта уровнем. Как показывают представленные данные, при почти двукратном различии генетически неродственных линий по нитрогеназной активности эффективность азотфиксации может быть одинаково высокой.

Следует отметить, что для большей части линий, превосходящих исходные сорта по активности, не удается достичь повышения эффективности азотфиксации. Причиной такого несовпадения может быть завышение азотфикссирующей активности за счет изменения соотношения ацетиленовой

Таблица 2

Урожай зеленой массы и содержание азота у различных сортов и линий гороха в стадии бутонизации цветения

Сорт, линия	Сырая масса 1 растения, г		Содержание азота в сухой зеленой массе, %	
	на биологическом азоте	на минеральном азоте	на биологическом азоте	на минеральном азоте
K-1680	3,14 ± 0,182	3,82 ± 0,266	3,14	2,25
1/2	2,90 ± 0,252	Не измеряли	1,70	Не измеряли
1/14	3,52 ± 0,151	7,82 ± 0,276	2,82	2,30
K-3268	3,31 ± 0,185	4,29 ± 0,267	3,00	2,12
2,6	3,52 ± 0,222	4,30 ± 0,159	2,77	2,36
K-3302	2,09 ± 0,095	2,58 ± 0,23	1,92	2,64
3,11	1,85 ± 0,094	1,71 ± 0,186	2,60	2,86
K-6365	1,79 ± 0,047	5,41 ± 0,307	3,57	3,03
13/1	1,74 ± 0,115	2,86 ± 0,141	3,43	3,43
K-4363	2,73 ± 0,156	8,32 ± 0,656	1,78	2,25
5/8	3,00 ± 0,094	7,12 ± 0,520	3,78	2,50
K-3315	4,26 ± 0,151	6,05 ± 0,344	2,52	2,39
6/6	2,45 ± 0,156	4,64 ± 0,260	1,99	2,27
K-5970	5,45 ± 0,200	5,28 ± 0,356	2,67	2,01
9/11	3,97 ± 0,157	5,03 ± 0,254	2,70	2,00
9/13	5,22 ± 0,437	5,19 ± 0,175	2,56	2,13
9/14	7,20 ± 0,474	5,75 ± 0,115	2,60	2,10
K-6335	3,31 ± 0,130	4,25 ± 0,153	2,56	2,16
32/4	5,82 ± 0,206	5,72 ± 0,253	2,46	2,15
K-6969	1,86 ± 0,125	7,84 ± 0,270	2,65	2,70
17/15	2,29 ± 0,063	2,85 ± 0,125	2,19	2,64
K-4400	1,10 ± 0,025	3,68 ± 0,068	2,21	1,92
50/3	1,37 ± 0,063	4,16 ± 0,062	2,39	2,59

редукции и связывания азота воздуха. В работе Скота с использованием $^{15}\text{N}_2$ у гороха было показано, что коэффициент $\text{C}_2\text{H}_4/\text{N}_2$ может меняться в широких пределах с возрастом растения [Scot, 1983].

Тем не менее, несмотря на некоторые недостатки, простота и высокая чувствительность ацетиленового метода делают его незаменимым на начальных этапах отбора. Линии, отличающиеся высокой нитрогеназной активностью, могут быть затем оценены на соответствующих безазотных фонах по их способности формировать полноценный урожай. Такой путь, по нашему мнению, оптимален для повышения эффективности симбиотической азотфиксации за счет селекции макросимбионта.

На основании полученных данных по ВНИИСХМ, ВИРе, ВНИИЗБКК и других учреждений нами подготовлены конкретные рекомендации по организации селекции растений на интенсивность симбиотической азотфиксации.

Одним из ключевых положений селекции является тот факт, что уровень активности азотфиксации тесно связан с потребностями растений. Это положение, хотя и кажется на первый взгляд очевидным, вместе с тем поднимает вопрос о конкретных путях, которыми растение может регулиро-

вать активность азотфикссирующих систем. До недавнего времени общепринятой была точка зрения, что это происходит вследствие изменения потока фотоассимилятов, поступающих в клубеньки. Она основывалась на экспериментах по затенению растений, дефолиации, увеличению количества побегов и других данных [Романов, 1983]. Все они указывали и на то, что взаимоотношения между азотфикссией и фотосинтезом — главный механизм, управляющий активностью нитрогеназного комплекса. Вместе с тем прямые попытки поднять активность азотфикссиции за счет селекции на повышение эффективности фотосинтеза оказались безрезультатными [Mahon, 1982].

Для изучения механизмов взаимодействия фотосинтеза и азотфикссиции нами была предложена уникальная генетическая модель — хлорофильные мутанты гороха, полученные в МГУ С.А. Гостимским [1981]. Помимо изучения энергетических характеристик, данная система интересна и для выяснения роли и особенностей действия на симбиоз генетических факторов высшего растения, которые не вовлечены прямо в этот процесс. Проведенное во ВНИИСХМ совместно с сотрудниками Института биохимии АН СССР им. А.Н. Баха детальное изучение симбиотических систем хлорофильных мутантов позволило подробно описать их особенности и высказать предположение о наличии весьма совершенного и высокочувствительного механизма регуляции нитрогеназной активности, непосредственно связанного как с фотосинтетическими возможностями растений, так и с его потребностями в фиксированном азоте.

Проведенные исследования показали [Алисова, Тихонович, 1983], что мутанты гороха, образующие различное количество хлорофилла, отличаются между собой по таким симбиотическим показателям, как масса и количество клубеньков, интенсивность азотфикссиции в динамике вегетации растений, реакция на дополнительно внесенный минеральный азот (табл. 3). Снижение содержания хлорофилла во всех случаях приводило к уменьшению интенсивности азотфикссиции. Хлорофильные мутанты характеризовались тем, что содержание азота в процентах от сухой массы растений у всех вариантов было близким. Исследование качественного состава поступающих в клубеньки углеводов [Романов и др., 1987] показало, что он был сходным у всех изученных форм. Следовательно, причина снижения показателей азотфикссиции заключается скорее не в поступлении фотоассимилятов, а в существовании механизма, определяющего размеры азотфикссиции в соответствии с потребностями растений в азоте.

Для изучения этого вопроса был проведен анализ ряда показателей, характеризующих обмен фотоассимилятов в клубеньках исходного сорта Немчиновский-766 и хлорофильного мутанта № 42, содержащего 50% хлорофилла от нормы. Важную информацию об обмене фотоассимилятов в клубеньках дают данные о наличии запасных веществ: крахмала в клетках растения-хозяина и поли- β -оксимиасляной кислоты (ПОМ) в бактериоидах (табл. 4). Содержание крахмала оказалось выше у растений дикого типа, где содержалось больше сахаров и процесс азотфикссиции шел интенсивнее, а содержание ПОМ в бактериоидах, наоборот, был заметно больше у хлорофильного мутанта.

По-видимому, содержание крахмала в данном случае определяется в первую очередь поступлением в клубеньки фотоассимилятов, а содер-

Таблица 3

Симбиотические свойства хлорофилльных мутантов гороха

Форма	Содержание хлорофилла, мг/г сырой массы	Интенсивность азотфиксации		Масса клубеньков, г	Сухая масса 1 растения, г	Содержание азота	
		мкмоль · г ⁻¹ · ч ⁻¹	мкмоль · г ⁻¹ · ч ⁻¹			% от сухой массы	мг/растение
Немчиновский-							
766	1,20	10,3	38,4	0,268	3,5	3,55	124,3
№ 23	1,08	3,3	19,6	0,168	1,5	3,28	42,6
№ 42	0,60	2,3	13,9	0,166	2,6	3,42	88,9
Капитал							
1,20		12,4	70,5	0,176	3,5	3,27	114,5
№ 2	1,32	14,3	73,7	0,194	3,4	3,26	110,8
№ 11	0,84	9,3	77,5	0,120	1,9	3,05	58,0
Торсдаг							
1,76		11,3	43,5	0,260	3,4	3,21	109,1
№ 15	1,20	8,4	48,5	0,173	2,0	3,63	72,6

Таблица 4

Содержание крахмала и поли-β-оксибутиратов в клубеньках

Вариант	Содержание крахмала	Содержание полиоксибутиратов	
		мкг · г ⁻¹ сырой массы клубеньков	
Немчиновский-			
766	16,6	59,7	
№ 42	7,3	132,8	

жение ПОМ больше связано с процессом азотфиксации, т.е. с расходованием энергетических субстратов в бактероидах. Из полученных данных нами совместно с В.И. Романовым [Тихонович и др., 1985] был сделан вывод о том, что даже при пониженном функционировании фотосинтетического аппарата и слабом потоке фотоассимилятов в клубеньки в бактероиды поступает все-таки энергетических субстратов больше, чем может быть ими израсходовано, из-за чего и накапливается ПОМ. Иначе говоря, в клубеньках хлорофилльного мутанта № 42 функционирование нитрогеназы, по-видимому, не лимитировано наличием доступного энергетического материала. Интенсивность же азотфиксации снижается вследствие иных причин, возможно связанных с ассимиляцией образовавшегося аммиака и его транспортом в надземную часть. В пользу такого предположения говорит и тот факт, что в клубеньках мутанта № 42 содержалось заметно больше аминокислот и особенно амидов, играющих важную роль в транспорте фиксированного азота у гороха (табл. 5). Можно предполагать в связи с этим, что ингибирование азотфиксации в клубеньках подобного

Таблица 5

Содержание свободных аминокислот в цитозоле клубеньков растений гороха, мг/г сырой массы клубеньков

Аминокислота	"Немчиновский-766"	№ 42	Аминокислота	"Немчиновский-766"	№ 42
Лизин	0-24	0,26	Глутаминовая кислота	1,72	1,75
Гистидин	0-63	0,27	Глутамин	1,51	4,41
Аспаригин+аспартовая кислота	8,10	10,95	Аланин	0,43	0,79
Серин	0,37	1,00	Валин	0,14	0,70
			Изолейцин	0,20	0,37
			С у м м а	13,30	40,48

рода мутантов происходит по принципу обратной связи за счет накопления продуктов фиксации.

Принимая во внимание, что даже у дефицитных по хлорофиллу растений клубеньки не страдают от недостатка фотоассимилятов, мало вероятно, что селекция бобовых растений на повышение фотосинтетической активности может привести к соответствующему увеличению азотфиксации. С другой стороны, как уже было показано нами выше, только активность нитрогеназы, измеренная ацетиленовым методом, адекватно характеризует состояние и продуктивность всей азотфикссирующей системы. В настоящее время селекция только по этому признаку позволяет получить формы бобовых растений с повышенной эффективностью азотфиксации. Следует, однако, иметь в виду, что активность нитрогеназы – комплексный признак, генетический контроль которого, в особенности со стороны растения, требует подробного изучения.

Следует подчеркнуть, что именно использование генетического подхода позволило выявить ряд важных моментов регуляции деятельности азотфикссирующего аппарата и выяснить возможности использования генов, прямо не связанных с процессом азотфиксации, для улучшения ее продуктивности.

Вместе с тем возможности гибридологического и мутационного анализа факторов азотфиксации у растений оказываются недостаточными для выявления всей системы генетического контроля процесса азотфиксации. Поэтому сейчас активно развиваются исследования по выявлению симбиотических генов как с помощью прямых методов обнаружения соответствующих последовательностей в геноме, так и по появлению продуктов этих генов на различных стадиях симбиоза. Такая постановка вопроса не означает отказ от использования классических методов генетического анализа. Более того, именно подбор генетических моделей с нарушениями различных этапов симбиоза позволяет определить происхождение белковых продуктов ("нодулинов"), а также выявить степень их специфичности. При этом возможность использования изменчивости со стороны обоих партнеров симбиоза значительно расширяет спектр вариаций и повышает чувствительность генетического анализа.

За последнее время удалось разработать значительное количество методов, позволяющих выявить функционирование генов в симбиотических системах. С использованием молекулярной гибридизации и иммунохимической техники выявлено целое семейство мРНК, специфически синтезируемых в клубеньках сои [Verma et al., 1983]. Исследованиями группы Бисселинга были выявлены также белки, появляющиеся только в симбиозе и названные "нодулинами" [Verma, Jong, 1983]. Наиболее типичными из нодулинов является леггемоглобин. Кроме леггемоглобина обнаружено еще 20–30 специфических для клубеньков нодулинов, появляющихся в процессе клубенькообразования на различных стадиях этого процесса [Govers et al., 1985]. Эти данные имеют важнейшее значение для понимания молекулярных механизмов азотфиксации и в то же время позволяют в самом общем виде представить, какое количество генетических факторов со стороны высшего растения принимают участие в становлении симбиотической азотфиксации. С помощью такого подхода удается описать активность более 20 различных генов растений, функционирование которых может значительно различаться как по времени, так и по степени выраженности, экспрессии, что указывает на существование различных механизмов регуляции их активности. При этом в неэффективных клубеньках также удается обнаруживать нодулины. Особый интерес представляют белки, исчезающие в процессе установления симбиотической азотфиксации. В целом пока еще не совсем ясно, какую роль играют те или иные белки-нодулины, но, очевидно, что именно их исследование необходимо для конструирования принципиально новых азотфикссирующих систем.

Изучение молекулярной организации генов, непосредственно вовлеченных в процесс симбиоза, позволило выявить некоторые новые черты организации генов у растений, связанные со структурой их регуляторных районов. Интересным в этом плане оказался ген *nod 23* у сои [Wong, Verma, 1985]. Ген *nod 23* был субклионирован в составе плазмида pBR 322 и использован для анализа промоторной области. Продукты гена – два тесно связанных полипептида (м.м. 23500 и 24500), мРНК соответствующего гена появляется на 5-й день после инфекции. Анализ нуклеотидной последовательности *nod 23* выявил сложную организацию регуляторного района, включающего как про-, так и эукариотические промоторы на 5'-конце.

Подробное рассмотрение молекулярной организации *nod 23* представляет определенный интерес для понимания особенностей функционирования симбиотических генов. Две нодулинспецифические мРНК этого гена отделены друг от друга 24 нуклеотидами.

Более короткий транскрипт представляет мажорный компонент мРНК, появляющийся в клубеньках на 21-й день после инкубации. Молекулярный анализ *nod 23* выявил также наличие двух промоторов растительного и животного типа, это может объяснить существование нескольких мРНК, возникающих или в ходе транскрипции или в ходе процессинга.

Наличие двух промоторов зарегистрировано и у генов других организмов – как про-, так и эукариот [Wong, Verma, 1985]. Однако для этого гена характерно наличие прокариотического промотора, что пока уникальное событие, явно связанное со специфическими функциями генов

симбиоза, обеспечивающими скоординированную работу наборов генетических факторов двух различных организмов.

В этой связи выделение и исследование таких генов представляет огромный интерес в плане эволюции генетических структур. Для выделения этих последовательностей наиболее целесообразно использование последовательностей разных видов бобовых, имеющих, вероятно, определенную гомологию. К таким последовательностям относятся гены леггемоглобина — гемопротеида, функция которого состоит во внутриклеточном транспорте кислорода [Appleby, 1984]. К настоящему времени получены полные аминокислотные последовательности некоторых фракций леггемоглобина для сои, люпина и других бобовых [Verma, Jong, 1983]. В лаборатории биотехнологии ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии проводится идентификация и клонирование хромосомных генов леггемоглобина гороха.

С использованием кДНК копии гена леггемоглобина (*Lb-a*) сои была отработана методика выделения соответствующих последовательностей гороха. Зонд метили ^{32}P и испытывали его специфичность с помощью дот-гибридизации. Хромосомная ДНК гороха отвечает на присутствие зонда, однако гомология является ограниченной. В составе хромосомной ДНК после рестрикции различными эндонуклеазами обнаружен фрагмент размером примерно в 1 тыс пар оснований, который предположительно располагается внутри последовательности, гомологичной гену *Lb-a* сои. Результаты рестрикционного анализа показывают, что в отличие от сои, у гороха при обработке одной и той же эндонуклеазой выделяются лишь два фрагмента, остальные же последовательности (до 15 фрагментов), имеющиеся в геноме сои, видимо, достаточно сильно дивергировали.

Известно, что индукция экспрессии генов *Lb* у гороха происходит только в ответ на заражение растения клубеньковыми бактериями; начинается на 10–11-й день после заражения и достигает максимума на 17-й день [Govers et al., 1985]. Нами была исследована экспрессия гена *Lb* гороха, гомологичного *Lb-a* сои. Для этого выделяли тотальную цитоплазматическую РНК из инфицированных корней гороха и анализировали ее на наличие гомологичных последовательностей методом дот-гибридизации. Результаты свидетельствуют, что на 15-й день после заражения в цитоплазме корней присутствуют мРНК, комплементарные гену *Lb-a*, и, таким образом, происходит экспрессия гена гороха, гомологичного гену *Lb-a* сои.

Таким образом, в понимании тонких молекулярных генетических механизмов, лежащих в основе симбиотической азотфиксации, достигнуты значительные успехи. Они несомненно должны будут играть определяющую роль как в совершенствовании уже существующих, так и создании совершенно новых азотфикссирующих систем. Ближайшая задача в этом плане — идентификация описанных нодулинов с ранее известными генами, определяющими признаки симбиотической азотфиксации. Однако, несмотря на то, что такая идентификация не проведена, имеются все условия для развертывания практической селекции по признакам азотфиксации и повышении на этой основе использования биологически фиксируемого, наиболее дешевого и экономически чистого азота.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Алисова С.М., Тихонович И.А. Использование хлорофилльных мутантов гороха в качестве модели для изучения взаимосвязи между фотосинтезом и симбиотической азотфиксацией // Генетика. 1983. Т. 19. С. 1512–1517.

Берестецкий О.А., Тихонович И.А. Повышение эффективности биологической фиксации азота за счет селекции бобовых по признакам симбиоза // Докл. ВАСХНИЛ. 1985. Т. 6. С. 9–11.

Говоров Л.И. Формы гороха из Абиссинии: К вопросу о происхождении культурных форм // Тр. по прикл. ботанике. 1930. Т. 24, вып. 2. С. 420–426.

Гостимский С.А. Генетический контроль фотосинтеза у высших растений: Автореф. дис. ... д-ра. биол. наук. М., 1981. 31 с.

Кожемяков А.П., Доросинский Л.М. Эффективность применения нитрагина в СССР // Бюл. ВНИИСельхозмикробиологии. 1981. № 34. С. 3–6.

Макашева Р.Х., Алисова С.М., Алексеева Е.Г. и др. Оценка симбиотических свойств гороха: Исходный материал, селекция и систематика бобовых культур // Сб. тр. по прикл. ботанике, генетике, селекции. 1985. Т. 91. С. 7–14.

Романов В.И. Энергетика симбиотической азотфиксации у бобовых и ее связь с фотосинтезом // Молекулярные механизмы усвоения азота растениями. М.: Наука, 1983. С. 92–121.

Романов В.И., Четкова С.А., Тихонович И.А., Черменская И.Е., Кретович В.Л. Азотфиксация и динамика поступления ^{14}C , ассимилированного листьями, в клубеньки хлорофилльных мутантов гороха // Физиология растений. 1987. Т. 34. С. 486–492.

Симаров Б.В., Тихонович И.А. Генетические основы бобово-ризобинального симбиоза // Минеральный и биологический азот в земледелии СССР. М.: Наука, 1985. С. 165–175.

Тихонович И.А., Алисова С.М., Четкова С.А., Берестецкий О.А. Повышение эффективности азотфиксации путем отбора линий гороха по активности нитрогеназы // С.-х. биология. 1987. № 2. С. 29–34.

Тихонович И.А., Романов В.И., Алисова С.М., и др. Азотфиксация и фотоассимиляты в клубеньках хлорофилльных мутантов гороха // Генетика. 1985. Т. 21. С. 1021–1025.

Четкова С.А., Тихонович И.А. Выделение и исследование штаммов *Rhizobium leguminosarum*, эффективных на горохах афганского происхождения // Микробиология. 1986. Т. 55. С. 143–147.

Alexander M. Ecology of *Rhizobium* // Biological nitrogen fixation ecology technology physiology. 1984. N.Y.; L: Plenum press, 1984. P. 39–50.

Appleby C.A. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration // Annu. Rev. Plant Physiol. 1984. Vol. 35. P. 443–478.

Bedmar E.J., Phillips D.A. *Pisum sativum* cultivar effects on hydrogen metabolism in *Rhizobium* // Canad. J. Bot. 1984. Vol. 62. P. 1682–1686.

Eisbrenner G., Evans H.J. Aspects of hydrogen metabolism in nitrogen-fixing legumes and other plant-microbe associations // Annu. Rev. Plant Physiol. 1983. Vol. 34. P. 105–136.

Govers F., Glondemann T., Moerman M. et al. Expression of plant genes during the development of pea root nodules // The EMBO J. 1985. Vol. 4. P. 681–687.

Gotz R., Evans I.J., Downie J.A., Johnston A.W.B. Identification of host-range DNA which allows *Rhizobium leguminosarum* strain TOM to nodulate Afganistan peas // Mol. Gen. Genet. 1985. Vol. 201. P. 296–300.

Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns H. The acetylene-reduction assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiol. 1968. Vol. 43. P. 1185–1207.

Hobbs S.L.A., Mahon J.D. Heritability of N_2 (C_2H_2) fixation rates and related characters in peas (*Pisum sativum* L.) // Canad. J. Plant Sci. 1982. Vol. 62. P. 265–276.

Lie T.A. Symbiotic specialization in pea plants the requirements of specific *Rhizobium* strains for peas from Afganistan // Ann. Appl. Biol. 1978. Vol. 88. P. 462–465.

Lie T.A., Timmermans P.C.J.M., Ladizinsky G. Host-controlled nitrogen fixation in Legume-*Rhizobium* symbiosis: Incompatibility of *Pisum sativum* L. ecotypes elatius

Bieb. and abyssinicum Braun with european R. leguminosarum strains // *Isr. J. Bot.* 1982. Vol. 31. P. 163–167.

Mahon J.D. Environmental and genotypic effects on the respiration associated with symbiotic nitrogen fixation in peas // *Plant Physiol.* 1979. Vol. 63. P. 892–897.

Mahon J.D. Field evaluation of growth and nitrogen fixation in peas selected for high and low photosynthetic CO_2 exchange // *Canad. J. Plant Sci.* 1982. Vol. 62. P. 1–17.

Nutman P.S. Genetics of symbiosis and nitrogen fixation in legumes // *Proc. Roy. Soc. London. B.* 1969. Vol. 172. P. 417–437.

Phillips D.A. Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1980. Vol. 31. P. 29–49.

Scot L. Relationship between C_2H_2 reduction, H_2 evolution and $^{15}\text{N}_2$ fixation in root nodules of pea (*Pisum sativum L.*) // *Physiol. plant.* 1983. Vol. 59. P. 581–584.

Verma D.P.S., Bergmann H., Fuller F., Freddie H. The role of plant genes in soybean–Rhizobium interactions // *Molecular genetics of the bacterial–plant interactions* / Ed. A. Pühler. Berlin: Heidelberg: Springer–Verlag, 1983. P. 156–183.

Verma D.P.S., Jong S. The molecular biology of Rhizobium–Legume symbiosis // *Intern. Rev. Cytol. Suppl.* 1983. Vol. 14. P. 211–245.

Winarno R., Lie T.A. Competition between Rhizobium strains in nodule formation: Interaction between nodulating and non-nodulating strains // *Plant Soil.* 1979. Vol. 51. P. 135–140.

Wong S.L., Verma D.P.S. Promotor analysis of a soybean nuclear gene coding for nodulin-23 a nodule specific polypeptide involved in symbiosis with Rhizobium // *The EMBO J.* 1985. Vol. 4. P. 2431–2438.

УДК 576.851.155

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕТЕРМИНАЦИИ СИМБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

A.A. Аронштам, Б.В. Симаров

Всесоюзный научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии, Ленинград

Повышенный интерес исследователей к клубеньковым бактериям возник благодаря уникальной способности этих микроорганизмов вступать в симбиоз с бобовыми растениями и обеспечивать их практически "бесплатным" азотом атмосферы. Развитие симбиотического органа (клубенька) представляет собой сложный многоступенчатый процесс, в котором происходят морфологические и биохимические изменения клеток обоих партнеров симбиоза [Vincent, 1980]. Эти изменения строго запрограммированы в генетическом аппарате как бактерий, так и бобовых растений и обусловливаются включением одних (симбиотических) и выключением других (вегетативных) генов. Активация симбиотических генов у макро- и микросимбионта происходит координированно при постоянном взаимодействии их продуктов на молекулярном уровне.

Эти общие представления, сложившиеся к началу 1980-х годов, в настоящее время начинают приобретать конкретное содержание благодаря интенсивному внедрению в изучение генетического контроля симбиотических свойств клубеньковых бактерий методов молекулярной генетики и генной

инженерии. Цель обзора – отразить современное состояние знаний о генах клубеньковых бактерий, ответственных за формирование азотфикссирующего симбиоза с бобовыми растениями, и факторах, влияющих на активность этих генов. Будут обсуждены также перспективы направленного конструирования штаммов этих микроорганизмов с улучшенными симбиотическими свойствами и возможности их практического использования.

СИМБИОТИЧЕСКИЕ ГЕНЫ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

В развитии бобово-ризобиального симбиоза традиционно выделялись две основные стадии: 1) формирование видимой морфологической структуры – клубенька; 2) сборка компонентов азотфикссирующего комплекса (нитрогеназа, леггемоглобин и др.) и ассимиляция атмосферного азота, приводящая к увеличению растительной биомассы. Таким образом, бактерии, способные обеспечивать развитие симбиоза до первой стадии, проявляли Nod^+ -фенотип (от английского *nodule* – клубенек), определяемый соответственно *nod*-генами. Полное развитие азотфикссирующего симбиоза соответствовало проявлению Fix^+ -фенотипа (*fixation* – фиксация) и действию *fix*-генов.

Уже достаточно давно было отмечено, что при инокуляции бактериями несвойственного им растения-хозяина развитие клубенька либо вообще не происходит, либо блокируется на первой стадии (например, если бактериями, выделенными из клубеньков люцерны, обработать растения гороха). Этот феномен хозяйствской специфичности позволил говорить о существовании у ризобий специальных *hsn*-генов (*host specific nodulation* – хозяйствская специфичность образования клубеньков). Проявление *hsn*-генов отражало строго комплементарный характер взаимодействия обоих партнеров симбиоза.

В исследованиях последних лет, в которых получение мутантов ризобий, не способных вступать в эффективный симбиоз с растением-хозяином, сочеталось с цитологическим анализом структур, образуемых на корнях бобовых растений такими мутантами, удалось вычленить несколько отдельных этапов как на первой, так и на второй стадии и показать наличие их генетического контроля. Так были выделены невирулентные мутанты, не изменявшие морфологию корневых волосков и не способные к ним прикрепляться (*Roa⁻*, *root adhesia* – корневая адгезия), а также прикрепляющиеся, но не искривляющие эти волоски (*Hac⁻*, *hair curling* – искривление волосков). Среди *Nod⁻*-мутантов оказались также такие, которые блокировали последующие стадии развития клубенька: не проникающие через инфекционную нить (*Inf⁻*); не индуцирующие размножение растительной меристемы (*Noi⁻*); не способные к формированию разветвленной инфекционной нити (*Inb⁻*). *Fix⁻*-мутанты могли блокировать развитие симбиоза на этапе освобождения бактерий из инфекционной нити (*Bar⁻*), дифференцировки в бактероиды (*Dib⁻*), что приводило к образованию клубеньков, лишенных азотфикссирующей активности. Сходный фенотип проявляли мутанты с дефектом в синтезе и сборке нитрогеназного комплекса (*Nif⁻*).

Все эти данные указывали на существование у ризобий достаточно большого числа генов, необходимых для формирования эффективного симбио-

за с растением-хозяином. В связи с этим в задачу анализа симбиотических генов входило выяснение их локализации в геноме ризобий, идентификация их продуктов и механизмов, контролирующих активность как внутри бактериальной клетки, так и со стороны растения.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ

Проблема генетического анализа симбиотических свойств ризобий своим решением во многом обязана гипотезе о детерминации способности этих микроорганизмов вступать в симбиоз с растением-хозяином со стороны внекромосомных автономно реплицирующихся генетических элементов — плазмид [Higashi, 1967]. В пользу этой гипотезы свидетельствовали данные о нестабильности симбиотических свойств ризобий при длительном культивировании на агаризованных средах и утрате их при обработке клеток повышенной температурой, акридиновыми красителями и другими агентами, которые у хорошо изученных микроорганизмов, таких, например, как кишечная палочка, вызывали "излечивание" от экстрахромосомной ДНК. Эта гипотеза стимулировала молекулярно-биологические исследования, направленные на поиск плазмид у ризобий, и предопределила специфическую методологию выявления у них симбиотических генов.

С помощью ультрацентрифугирования в градиенте хлористого цезия в присутствии интеркалирующего агента (бромистого этидия) из подготовленных особым образом клеточных лизатов из целого ряда штаммов быстрорастущих видов клубеньковых бактерий удалось выделить препараты плазмидной ДНК и выяснить ее молекулярную массу. Был разработан метод массового экспресс-анализа штаммов ризобий на присутствие плазмид путем электрофореза в агарозном геле микрокаличеств клеточных лизатов [Rosenberg et al., 1981]. При этом оказалось, что экстрахромосомная ДНК ризобий превосходила по своим размерам в 10–100 раз плазмиды кишечной палочки, псевдомонад и многих других микроорганизмов. Причем многие штаммы могли содержать несколько таких больших плазмид, варьирующих как по числу, так и по размеру.

Прямое указание на причастность плазмид к детерминации симбиотических свойств было получено в экспериментах, сочетавших их электрофоретический анализ и "излечивание" ризобий, от способности к клубенькообразованию при культивировании при сублетальной температуре [Hombrecher et al., 1981]. Были выделены мутанты клубеньковых бактерий клевера, гороха, фасоли, утратившие способность к симбиозу с растением-хозяином и одновременно одну из больших плазмид.

У клубеньковых бактерий люцерны "подозрение" на причастность к симбиозу пало на плазмиду необычайно большого размера (свыше 400 МДа [Banfalvi et al., 1981], так как при анализе большой коллекции штаммов различного географического происхождения эта плазмиды присутствовала во всех образцах, в то время как состав плазмид с меньшей молекулярной массой значительно варьировал. Во многих штаммах выявлялась только одна гигантская плазмимда (мегаплазмиды). С помощью температурной обработки были выделены невирулентные мутанты с делецией приблизительно 10% ДНК мегаплазмиды, что удалось зарегистрировать по небольшому изменению электрофоретической подвижности (рис. 1).

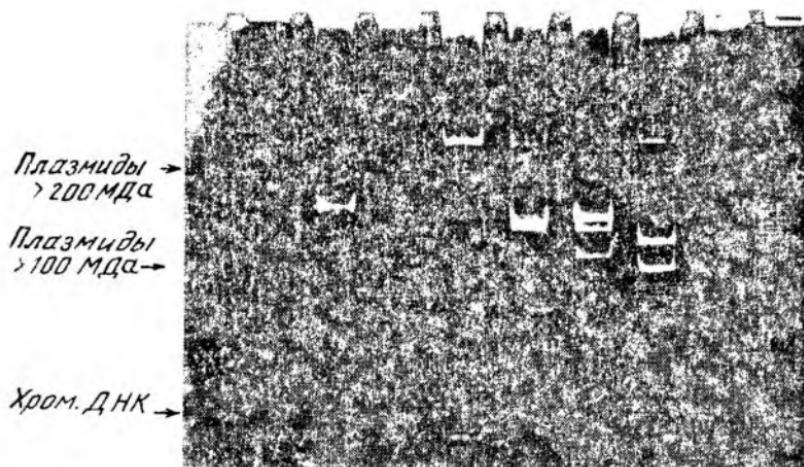


Рис. 1. Плазмиды штаммов клубеньковых бактерий люцерны различного географического происхождения [Злотников и др., 1985]

Очень ценным подспорьем в этих исследованиях оказалось использование достижений молекулярно-генетического анализа азотфикссирующей активности у свободноживущего азотфиксатора *Klebsiella pneumoniae* [Ausubel, Cannon, 1981]. У этой бактерии было выявлено 17 генов, необходимых для синтеза и нормального функционирования ферментативного комплекса нитрогеназы. Из них три гена непосредственно кодировали аминокислотную последовательность трех полипептидных цепей, составляющих большую и малую субъединицу этого фермента (Мо- и Fe-белки). Эти *nif*-гены с помощью техники рекомбинантных ДНК были клонированы в составе специальной векторной плазмида *pSa30*. Оказалось, что они проявляют значительное структурное сходство (по данным молекулярной гибридизации ДНК-ДНК) с аналогичными генами практически всех известных азотфикссирующих микроорганизмов, в том числе и ризобий. Плазмида *pSa30* была использована в качестве радиоактивного зонда в экспериментах по блоттинг-гибридизации для поиска плазмид и фрагментов генома, содержащих соответствующие *nif*-гены клубеньковых бактерий.

У быстрорастущих ризобий положительную реакцию с *pSa30* дали те же самые плазмиды, которые по данным "излечивания" несли гены, ответственные за образование клубеньков. При этом индуцированные температурой невирулентные мутанты, утратившие лишь небольшой фрагмент симбиотической плазмида, как правило, не гибридизовались с *pSa30*, что указывало на одновременную потерю генов вирулентности и *nif*-генов и, следовательно, на их достаточно близкое расположение относительно друг друга в пределах утраченной области экстрахромосомной ДНК.

Вместе с тем у медленнорастущих штаммов клубеньковых бактерий сои, лядвенца, ряда тропических бобовых положительная реакция с генами *Klebsiella* наблюдалась только при анализе общей геномной ДНК (предварительно обработанной соответствующей рестриктазой), в то время как интактные плазмиды не гибридизовались с *pSa30*. У этих же видов ризо-

бий "температурное излечивание" от плазмид не сказывалось на их способности вступать в симбиоз с растением-хозяином, что свидетельствовало о локализации симбиотических генов в бактериальной хромосоме [Masterson et al., 1985]. Промежуточное положение между двумя группами ризобий занимают недавно обнаруженные быстрорастущие бактерии, вступающие в симбиоз с дикими сортами сои, у которых симбиотические гены присутствуют в нескольких копиях и могут располагаться как в хромосоме, так и на плазмidaх.

ПЕРЕНОС СИМБИОТИЧЕСКИХ ПЛАЗМИД

Как уже отмечалось, симбиотические плазмиды экспрессируются, в основном в клубеньках, а контролируемые ими отдельные признаки вегетативных клеток (продукция бактериоцинов, образование пигментов, выделение экзополисахаридов) не позволяют эффективно следить за их "поведением" при гибридизации различных штаммов ризобий. Эта трудность была преодолена путем введения в состав экстрахромосомной ДНК генов устойчивости к антибиотикам. В качестве доноров этих генов были использованы мигрирующие генетические элементы — транспозоны.

На основе плазмид кишечной палочки были созданы специальные переносчики транспозона (*Tn5*, устойчивость к канамицину), которые легко вводились в ризобии при конъюгации, но, будучи не способными в них реплицироваться, быстро элиминировались, тогда как транспозон случайным образом перемещался либо в хромосомные, либо в плазмидные репликоны [Beringer et al. 1982]. Включение в состав плазмиды оценивалось в индивидуальных скрещиваниях транспозантов с невириулентными штаммами-реципиентами по приобретению ими устойчивости к канамицину и восстановлению симбиотических свойств. Таким образом были маркированы симбиотические плазмиды клубеньковых бактерий гороха, клевера, фасоли.

Маркированные симбиотические плазмиды позволили создать необычные межвидовые гибриды ризобий с измененными симбиотическими свойствами. Так, если в невириулентный мутант клубеньковых бактерий клевера вводилась симбиотическая плазмиды *R. leguminosarum*, то полученные трансконъюганты могли вступать в эффективный симбиоз с новым хозяином — горохом. Сходные изменения симбиотических свойств наблюдались в реципрокных скрещиваниях, в результате чего *R. leguminosarum* образовывал клубеньки на клевере. Более того, перенос симбиотических плазмид в бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, также относящиеся к семейству *Rhizobiaceae*, приводил к тому, что эти микроорганизмы стали инициировать ранние стадии клубенькообразования вплоть до появления видимых морфологических структур на корнях соответствующих видов бобовых растений (рис. 2).

Продемонстрирована также возможность создания более отдаленных гибридов на основе симбиотических плазмид ризобий и бактерий рода *Lignobacter*, *Pseudomonas* и даже *Escherichia coli*.

Применение подобной стратегии для симбиотической плазмиды клубеньковых бактерий люцерны потребовало введения в нее дополнительных генов (тоб-сайт конъюгативного R-фактора). Такая модифицированная

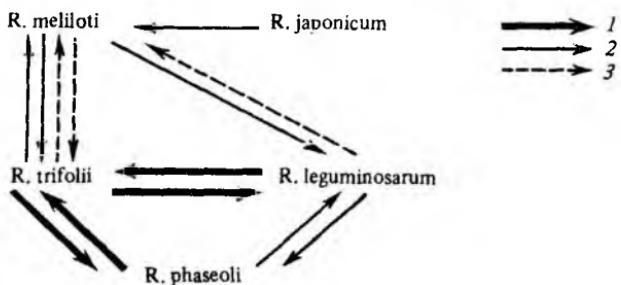


Рис. 2. Перенос симбиотических признаков на плазмидах различных видов клубеньковых бактерий при межвидовой гибридизации

1 – реципиент приобретает способность к образованию азотфикссирующих клубеньков на растении-хозяине штамма-донара; 2 – реципиент приобретает способность образовывать клубеньки, лишенные азотфиксации на растении-хозяине штамма-донара; 3 – у авирулентного реципиента восстанавливается способность к симбиозу с исходным растением-хозяином [Проворов, Симаров, 1987]

плазмиды могла быть перенесена с помощью R-фактора в другие виды ризобий (например, вступающие в симбиоз с тропическими бобовыми), в агробактерии, и полученные гибриды приобретали способность к образованию клубеньков на люцерне [Simon, 1984].

Следует отметить, что изменение хозяйствской специфичности при межвидовых переносах симбиотических плазмид наблюдалось, как правило, в том случае, если штамм-реципиент был "излечен" от собственных симбиотических свойств, что позволяло интродуцированной экстрахромосомной ДНК "приживаться" в чужеродном окружении и проявлять действие своих генов. При использовании точковых невирулентных мутантов в качестве реципиентов перенос гетерологичных симбиотических плазмид способствовал восстановлению вирулентности по отношению к исходному растению-хозяину без изменения специфичности. В то же время некоторые мутации по клубенькообразованию не могли быть комплементированы переносом симбиотических плазмид из близкородственных видов ризобий. Этот факт послужил основанием для выделения среди генов вирулентности "общих" под-генов, функционально заменяемых у многих видов ризобий, контролирующих, по-видимому, сходные в разных симбиотических системах самые первые стадии взаимодействия бактерий и растений. Последующие стадии развития симбиоза детерминируются видоспецифичными *hsn*-генами, экспрессия которых контролируется факторами, свойственными только основному растению-хозяину, и поэтому невозможно восполнение функции этих генов за счет чужеродного генетического материала.

КЛОНИРОВАНИЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ

Изучение плазмид позволило выделить в геноме быстрорастущих ризобий фрагмент ДНК размером 50–80 тыс. пар нуклеотидов (т.п.н.), содержащий основные симбиотические гены. Для точного выяснения числа и взаимного расположения этих генов, а также идентификации их продуктов необходимо иметь их в дискретном максимально очищенном и концентрированном

состоянии. Такая возможность предоставляется благодаря методам молекулярного клонирования, позволяющим отдельные гены перевести в состав небольших многокопийных векторных плазмид и затем оценить их индивидуальную экспрессию в гомо- и гетерологичном окружении.

В работе по клонированию симбиотических генов ризобий используется несколько подходов, отличающихся по способам отбора нужных рекомбинантных плазмид из "банка" генов. "Банк" (или библиотека) обычно получается путем нарезания всей геномной ДНК на отдельные фрагменты размером 10–25 т.п.н. с помощью ферментов рестрикции (наиболее часто используется рестриктаза EcoRI). Далее в реакции лигирования все фрагменты включаются в состав либо небольших векторных плазмид, реплицирующихся только в *E. coli* (pBR322, pBR325 / pSUP202), либо в дериваты фага λ этой бактерии (λ EMBL3). Наибольшее распространение получила плазмида pRK290 и ее дериват pLAFR1, содержащий cos-фрагмент фага λ . Оба эти вектора могут существовать как в кишечной палочке, так и в ризобиях.

Полученный таким образом набор рекомбинантных плазмид вводится трансформацией в *E. coli*, а затем может быть переведен при конъюгации с помощью мобилизующих плазмид в ризобии.

Первый вариант отбора заключается в том, что смесь рекомбинантных плазмид (на основе pLAFR1), содержащих случайным образом интегрированные фрагменты генома клубеньковых бактерий люцерны, переводят в невирулентный мутант и все трансконъюганты используют для инокуляции проростков люцерны. На отдельных растениях через месяц формируются единичные клубеньки, из которых выделяют бактерии, содержащие векторные плазмиды с включенными в их состав nod-генами, восполняющими недостающий у штамма-реципиента генетический материал, необходимый для образования клубеньков. Таким образом, в данном случае селекцию из "банка" клонированных nod-генов осуществляет фактически само растение [Kondorosi et al., 1984] (рис. 3).

Более сложная методология используется во втором подходе. На первом этапе получают мутанты, дефектные по тем или иным симбиотическим свойствам, с помощью транспозонов. Выделение таких мутантов требует индивидуальной проверки нескольких тысяч транспозантов в условиях стерильного микровегетационного опыта. У выделенных мутантов инактивированные симбиотические гены приобретают легкотестируемый маркер (устойчивость к антибиотику), что позволяет клонировать соответствующий фрагмент ДНК обычными приемами генной инженерии в плазмидах кишечной палочки. Рекомбинантные плазмиды, содержащие инактивированные симбиотические гены, используются в качестве "зонда" при молекулярной гибридизации с лизатами клонов *E. coli*, в которые введен "банк" ризобиального генома штамма дикого типа. Такой "зонд" давал положительную реакцию гибридизации с единичными клонами *E. coli*, содержащими нормальные симбиотические гены. Из этих клонов выделяли рекомбинантные плазмиды и переводили их конъюгацией в соответствующие мутанты ризобий для оценки их функций. Таким образом, были клонированы nod- и nif-гены клубеньковых бактерий лядвенца, гороха, фасоли, клевера [Scott et al., 1985].

Третий подход базируется на структурной гомологии симбиотических

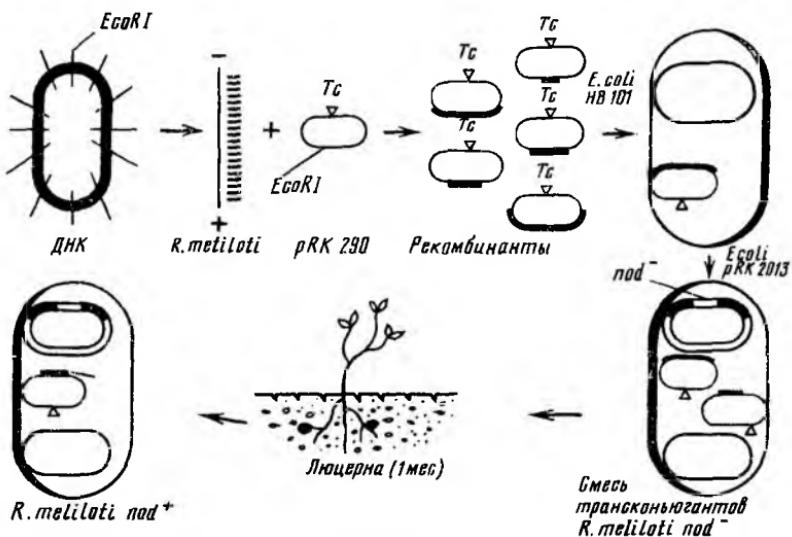


Рис. 3. Схема клонирования генов вирулентности у клубеньковых бактерий люцерны [Long et al., 1982]

генов у разных видов ризобий. Клонированные общие *nod*-, *fix*- и *nif*-гены, например клубеньковых бактерий люцерны, были успешно использованы для выявления соответствующего генетического материала из "банка" бактерий, вступающих в симбиоз с соей, тропическими бобовыми культурами по схеме, описанной выше [Russel et al., 1985; Hom et al., 1985].

ОРГАНИЗАЦИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ У РИЗОБИЙ

Использование техники молекулярного клонирования привело к тому, что в настоящее время во многих лабораториях, занимающихся генетикой симбиоза, созданы коллекции рекомбинаントных плазмид, содержащих индивидуальные симбиотические гены. Наиболее полная и разнообразная коллекция таких плазмид получена для клубеньковых бактерий люцерны [Kondorosi E., Kondorosi A., 1986]. Например, в состав конъюгативного R-фактора (R 68.45) введена практически вся симбиотическая область мегаплазмиды этих ризобий (около 60 т.п.н.). В плазмиде pBR322 (один из самых распространенных векторов в генной инженерии) клонированы структурные гены нитрогеназы (*nifkDH*). Эти же гены вместе с локализованными поблизости *fix*-генами встроены в космидный вектор pEK5022. На основе pRK290 получены рекомбинаントные плазмиды, содержащие наборы общих *nod*-генов и генов, определяющих специфичность взаимодействия с растением-хозяином и т.д.

Физический анализ этих плазмид (картирование с помощью ферментов рестрикции, определение нуклеотидной последовательности, оценка направления транскрипции и др.) дал возможность построить достаточно подробную карту симбиотической области клубеньковых бактерий люцерны. Выяснилось, что общие *nod*-гены у этих ризобий организованы в два опе-

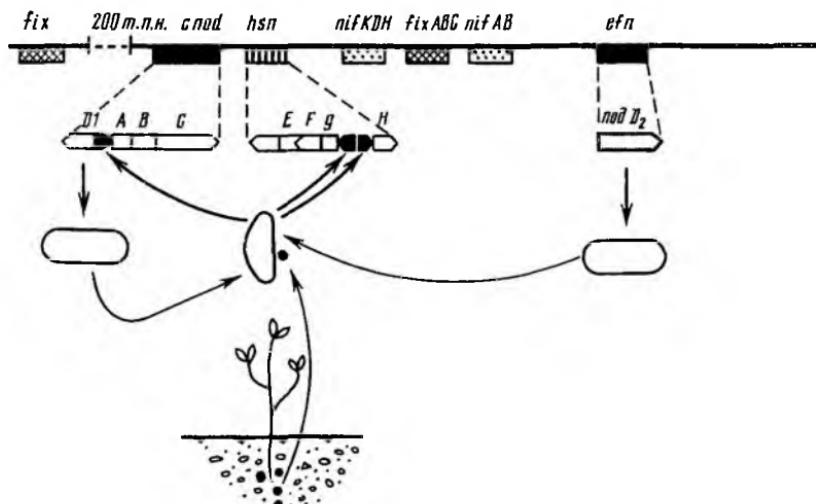


Рис. 4. Генетическая карта симбиотической области клубеньковых бактерий люцерны [Kondorosi E., Kondorosi A., 1986]

рона. Первый оперон состоит из трех генов *nodABC*, мутации в которых блокируют самые ранние этапы симбиоза (Roa^- -и Hac^- -фенотип). Второй оперон представлен геном *nodD*, расположенным в непосредственной близости от первого, но транскрибуирующимся в противоположном направлении. Мутации *nodD* приводят к задержке клубенькообразования. Недавно обнаружено, что в геноме клубеньковых бактерий люцерны присутствует дополнительная копия этого гена — *nodD2*, расположенная вне основной симбиотической области мегаплазмиды (рис. 4).

Гены, отвечающие за специфичность взаимодействия бактерий с растением-хозяином, также сгруппированы в два оперона: *hsnABC* и *hsnD*. Мутации в первом опероне блокируют искривление корневых волосков (Hac^-) и развитие инфекционной нити (Inf^-), а во втором приводят к тому, что бактерии, утратив способность вступать в симбиоз с люцерной, сохраняют вирулентность по отношению к другому представителю этой же группы перекрестной инокуляции — белому доннику. Недалеко от *hsn*-генов локализуется оперон структурных генов нитрогеназы (*nifKDH*) и кластер генов, влияющих на их активность (*nifAB*) и проявляющих структурную гомологию с регуляторными *nif*-генами *K. pneumoniae*.

Однако между этими генами недавно удалось выявить группу из трех генов (*fix*), мутации в которых приводят к отсутствию азотфикссирующей активности в клубеньках. Гены со сходным фенотипическим проявлением локализованы также вне симбиотической области мегаплазмиды. Более того, было обнаружено, что клубеньковые бактерии люцерны содержат дополнительную экстрахромосомную ДНК приблизительно такого же размера, как и сим-плазмиды. На этой второй мегаплазмиде выявлен генетический материал, контролирующий выработку вегетативными клетками экзоклеточного полисахарида, мутации в котором приводят к по-

тере нитрогеназной активности. Несколько fix-генов локализовано в хромосоме клубеньковых бактерий [Forrai et al., 1983].

Сходная картина, показывающая множественность и сложность генетического контроля симбиотических свойств, имеет место и у других быстрорастущих клубеньковых бактерий [Downie et al., 1985]. Накапливающиеся в последнее время данные по медленнорастущим ризобиям приведут, по-видимому, к созданию аналогичной генетической карты с той лишь разницей, что симбиотическая область будет входить в состав хромосомы, а не плазмид.

ВЛИЯНИЕ РАСТЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ СИМБИОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ

Разработка техники рекомбинантных ДНК применительно к клубеньковым бактериям позволила оценить, каким образом происходит активация симбиотических генов в ответ на "сигналы" со стороны растения. Были созданы специальные векторные плазмиды, содержащие лишенный промотора ген для фермента кишечной палочки β -галактозидазы. Проявление этого гена, тестируемое по простой ферментативной реакции, было возможным только при постановке его под какой-либо промотор, активируемый соответствующим индуктором. В качестве источника такого промотора были использованы nod- и hsn-гены клубеньковых бактерий гороха, клевера, люцерны, встроенные непосредственно перед lacZ [Mulligan, Long, 1985]. При этом восстановление галактозидазной активности могло иметь место только в случае активации транскрипции соответствующих ризобиальных генов.

Оказалось, что активация генов клубенькообразования в вегетативных клетках (плазмиды вводились либо в кишечную палочку, либо в ризобии) происходила при добавлении эксудатов молодых проростков растений-хозяев. Только ген nodD мог восстанавливать активность β -галактозидазы в отсутствие растительных "сигналов". Было показано также, что активация nodABC корневыми эксудатами требует нормального функционирования nodD. Появились указания, что в качестве "сигнала" могут выступать низкомолекулярные соединения фенольной природы, которые, по-видимому, взаимодействуют с продуктом гена nodD, и такой уже активированный индуктор включает остальные гены, ответственные за развитие клубенька. Сходная ситуация недавно продемонстрирована для близкородственной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, у которой включение генов онкогенности осуществляется самим растением посредством выделения ароматического соединения — альдегида ацетилсирингиновой кислоты.

ПЕРСПЕКТИВЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ ШТАММОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ С УЛУЧШЕННЫМИ СИМБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Фундаментальные исследования в области структурно-функциональной организации симбиотических генов имеют в качестве конечной цели создание методических и теоретических предпосылок для конструирования штаммов клубеньковых бактерий, которые способствовали бы реализации всего

азотфиксирующего потенциала бобовых растений. Такое конструирование предполагает совмещение в одном штамме различных хозяйствственно-ценных признаков (например, повышенная нитрогеназная активность, адаптивность к конкретным агротехническим условиям, включая тип почв, сорт растения-хозяина, использование гербицидов и т.д.) путем введения в него векторных плазмид с набором соответствующих клонированных генов.

Однако если общую методологию конструирования таких штаммов можно считать разработанной, то вопрос об идентификации "полезных" признаков (и соответственно генов, их детерминирующих) становится все более актуальным и требует еще своего разрешения. В частности, уже предпринимались попытки повысить азотфиксирующую активность некоторых штаммов ризобий с помощью клонированных генов фермента — гидрогеназы [Cunningham et al., 1985]. Клонированы и использованы в качестве "усилителя" азотфиксации гены для транспорта дикарбоновых кислот, являющихся энергетическим источником нитрогеназного комплекса [Bolton et al., 1986]. Полученные таким путем штаммы не всегда и не в достаточной степени оказывали влияние на урожайность растения-хозяина.

Пока более надежный эффект дает использование традиционных методов гибридизации (с помощью собственных плазмид или R-факторов) и мутагенеза (нитрозогуанидин, УФ-свет, транспозоны) с последующим массовым анализом и отбором "+"-вариантов в условиях вегетационных опытов. В настоящее время получены перспективные гибридные и мутантные штаммы клубеньковых бактерий люцерны, гороха и других культур, превосходящие на 15–20% исходные формы по накоплению азота и сухой биомассы [Аронштам и др., 1983; Шарыпова и др., 1987; Sorensen, Wyndale, 1986]. По-видимому, такой подход вместе с селекцией перспективных природных изолятов будет еще долго обеспечивать производство промышленных инокулянтов достаточно активными штаммами ризобий. Вместе с тем кардинальное решение проблемы симбиотической азотфиксации и использование всех ее резервов, в том числе и создание новых симбиотических систем, несомненно будут базироваться на последних достижениях молекулярной генетики и генной инженерии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Аронштам А.А., Чернова Т.А., Симаров Б.В. Восстановление симбиотических свойств у мутантов *Rhizobium meliloti* при конъюгации // Генетика. 1983. Т. 19, № 4. С. 559–564.

Злотников К.М., Румянцева М.Л., Аронштам А.А. Анализ плазмид у штаммов *Rhizobium meliloti* различного географического происхождения // Молекуляр. генетика, микробиология, вирусология. 1985. № 8. С. 13–15.

Проворов Н.А., Симаров Б.В. Генетический контроль хозяйствской специфичности клубеньковых бактерий // Успехи соврем. генетики. 1987. Вып. 14. С. 90–114.

Шарыпова Л.А., Онищук О.П., Новикова Н.И. и др. Мутагенная активность плазмидных векторов — "самоубийц", содержащих *Tn* 5, у клубеньковых бактерий люцерны // Генетика. 1987. Т. 23, № 12. С. 2104–2111.

Ausubel F.M., Cannon F.C. Molecular genetic analysis of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation genes // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1981. Vol. 45. P. 487–498.

Banfalvi Z., Randhawa G., Koncz C. et al. Location of nodulation and nitrogen fixation genes on high molecular weight plasmid of *Rhizobium meliloti* // Mol. and Gen. Genet. 1981. Vol. 184. P. 318–325.

Beringer J., Beynon J., Buchanan-Wollaston A., Johnston A. Transfer of the drug resistance transposon Tn5 to *Rhizobium* // *Nature*. 1982. Vol. 298. P. 485–488.

Bolton E., Higginson B., Herrington A., O'Gara F. Dicarboxylic acid transport in *Rhizobium meliloti*: isolation of mutants and cloning of dicarboxylic acid transport genes // *Arch. Microbiol.* 1986. Vol. 144. P. 142–144.

Cunningham S., Kapulnik Y., Brewin N., Phillips D. Uptake hydrogenase activity determined by plasmid pRL6J1 in *Rhizobium leguminosarum* does not increase symbiotic nitrogen fixation // *Appl. and Environ. Microbiol.* 1985. Vol. 50. P. 791–794.

Downie A., Ma Q-S., Knight C., Hombrecher G., Johnston A. Cloning of the symbiotic region of *Rhizobium leguminosarum* // *Europ. Mol. Biol. Org. J.* 1985. Vol. 2. P. 947–952.

Forrai T., Vicze E., Banfalvi Z. et al. Localization of symbiotic mutations in *Rhizobium meliloti* // *J. Bacteriol.* 1983. Vol. 153. P. 635–648.

Higashi S. Transfer of clover infectivity of *Rhizobium trifolif* to *Rhizobium phaseoli* as mediated by an episome // *J. Gen and Appl. Microbiol.* 1967. Vol. 13. P. 391–403.

Hom S., Gracham L., Maier R. Isolation of genes nif/hup cosmids involved in hydrogenase and nitrogenase activity in *Rhizobium japonicum* // *J. Bacteriol.* 1985. Vol. 161. P. 882–887.

Hombrecher G., Brewin N., Johnston A. Linkage of genes for nitrogenase and nodulation ability on plasmids in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli* // *Mol. and Gen. Genet.* 1981. Vol. 182. P. 133–136.

Kondorosi E., Kondorosi A. Nodule induction on plants roots by *Rhizobium* // *Trends Biochem. Sci.* 1986. Vol. 11. P. 296–299.

Kondorosi E., Banfalvi Z., Kondorosi A. Physical and genetic analysis of symbiotic region of *Rhizobium meliloti* // *Ibid.* 1984. Vol. 193. P. 445–452.

Long S., Buikema W., Ausubel F. Cloning of symbiotic nodulation genes of *Rhizobium meliloti* by direct complementation of nod-mutants // *Nature*. 1982. Vol. 298. P. 485–488.

Masterson R., Prakash R., Atherly A. Conservation of symbiotic nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium japonicum* // *J. Bacteriol.* 1985. Vol. 163. P. 21–26.

Mulligan J., Long S. Induction of *Rhizobium meliloti* nod C expression by plant exudate requires nod D // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1985. Vol. 82. P. 6609–6613.

Rosenberg C., Boistard P., Denarie J., Casse-Delbart F. Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on megaplasmid in *Rhizobium meliloti* // *Mol. and Gen. Genet.* 1981. Vol. 194. P. 326–333.

Russel R., Schell M., Nelsin K. et al. Isolation and characterization of DNA-region encoding nodulation functions in *Bradyrhizobium japonicum* // *J. Bacteriol.* 1985. Vol. 164. P. 1301–1308.

Scott B., Chua K-Y., Jarvis B., Pankhurst C. Molecular cloning of nodulation genes from fast and slow growing strains of *Lotus rhizobia* // *Mol. and Gen. Genet.* 1985. Vol. 201. P. 43–50.

Simon R. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-mob transposon // *Ibid.* 1984. Vol. 196. P. 413–420.

Sorensen G., Wyndale R. Effect of symbiotic plasmids and hydrogenase genes (hup) on symbiotic efficiency of *Rhizobium leguminosarum* strains // *J. Gen. Microbiol.* 1986. Vol. 132.

ИНВЕРТАЗА БАКТЕРОИДОВ *RHIZOBIUM LUPINI*

И.Е. Черменская, З.Н. Цагурия, В.И. Романов, В.Л. Кретович

Институт биохимии им. А.Н. Баха АН СССР, Москва

Гидролиз сахарозы — первый и весьма важный этап усвоения фотоассимилятов в клубеньках. Метаболизм продуктов распада сахарозы составляет основу углеродного обмена клубеньков, в результате которого происходит обеспечение процесса азотфиксации энергией и аммиаксвязывающими субстратами. Тем не менее механизмы гидролиза сахарозы в клубеньках изучены недостаточно. Имеются данные о том, что гидролиз сахарозы в клубеньках осуществляется в основном инвертазой растения-хозяина, т.е. ферментом, локализованным в растительной части клубеньков [Kidby, 1966; Robertson, 1973; Morell, Cope~~land~~, 1984]. Попытки обнаружить инвертазную активность в бактеридах, выделенных из клубеньков сои, люпина и сераделлы, были малоуспешными. Однако имеются данные о том, что у некоторых видов *Rhizobium* в присутствии сахарозы индуцируется внеклеточная инвертаза [Singh et al., 1980]. Ранее нами было показано, что в клубеньках желтого люпина в гидролизе сахарозы участвуют оба симбионта [Черменская и др., 1984]. Задача настоящей работы состояла в изучении инвертазы бактерида *Rhizobium lupini*, ее локализации и роли в процессе фиксации азота.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Растения люпина желтого *Lupinus luteus* L. (сорт Быстрорастущий 4), инокулированные эффективным штаммом *Rhizobium lupini*, выращивали в вегетационном домике в сосудах с кварцевым песком на питательной смеси Прянишникова, лишенной связанного азота [Федурова и др., 1980]. Отделенные от корней клубеньки помещали в измельченный лед, все дальнейшие операции по выделению вели на холода [Черменская и др., 1984].

В опытах, в которых бактериды подвергали действию осмотического шока, 10 г пасты клеток при помощи пестикового гомогенизатора супензировали в 100 мл 0,01 М трис-НСl буфера pH 8,0. Полученную супензию центрифугировали при 5000 g 20 мин для осаждения бактерида (сферопластов). Супернатант повторно центрифугировали при 200000 g для получения мембран (осадок) и содержимого перiplазматического пространства (супернатант). Отмытые бактериды после осмотического шока супензировали в 0,1 М К-фосфатном буфере pH 7,0 в соотношении 1 : 2 (влажная масса/объем, добавляя ДНКазу, 0,5 мг/г сырой массы бактерида в случае разрушения) и разрушали в прессе типа Итона [Федурова и др., 1980] или ультразвуком на установке MSE-500. Разрушенные бактериды центрифугировали 20 мин при 5000 g. Для определения активности инвертазы осадки бактерида, суммарную фракцию мембран и частиц после разрушения бактерида супензировали в минимальном объеме 0,1 М К-фосфатного буфера pH 7,0 и определяли активность фермента

[Черменская и др., 1984], активность β -оксибутиратдегидрогеназы изменили по методике, описанной ранее [Федулова и др., 1980].

В опытах с проназой использовали суспензию бактериоидов в 0,1 М К-фосфатном буфере pH 7,0 в соотношении 1 : 2, коммерческий препарат проназы добавляли в количестве 2 мг/мл или 0,24 мг/мл и инкубировали 2 ч при 25°C. Бактериоиды отмывали один раз тем же буфером и определяли активность инвертазы. Контролем служила суспензия бактериоидов в 0,1 М К-фосфатном буфере pH 7,0 без добавления проназы. Белок определяли по Лоури, при определении белка в суспензии бактериоидов проводили предварительный щелочного гидролиз проб в 0,5 N NaOH.

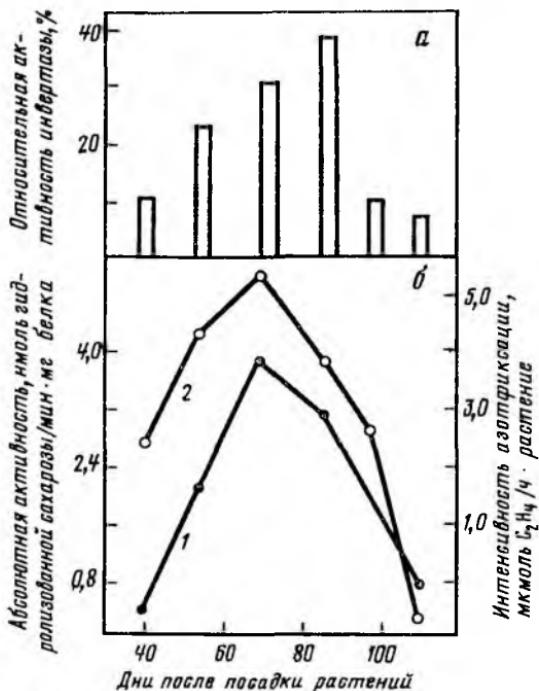
В работе использовали пероксидазу и сахарозу фирмы "Reanal", а также проназу фирмы "Calbiochem", которая представляет собой сумму 9–11 протеолитических ферментов трипсинового действия; остальные реактивы отечественного производства марки хч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время доказано, что при низкой концентрации O_2 сахароза может служить источником энергии для фиксации азота целыми бактериоидами, изолированными из клубеньков различных бобовых растений [Trinchant et al., 1981]. В нашей лаборатории показано также, что в суспензии бактериоидов *R. lupini* в присутствии сахарозы и аммония происходит синтез аминокислот [Кретович и др., 1982]. Из этих данных очевидно, что бактериоиды способны сахарозу утилизировать. С другой стороны, в экстрактах из бактериоидов люпина [Robertson, Taylor, 1973] и сои [Morell, Soreland, 1984] была обнаружена только слабая активность инвертазы, которую авторы были склонны считать примесью фермента растения-хозяина. Для выяснения этого вопроса нами были поставлены опыты по распределению активности инвертазы в суспензии целых бактериоидов в сравнении с активностью инвертазы в экстракте после их разрушения в прессе. Из приведенных ниже данных видно, что целые бактериоиды гидролизовали сахарозу гораздо активнее, чем разрушенные. Это ясно указывает на то, что для гидролиза сахарозы бактериоидами весьма важным является сохранение целостности их структуры.

Бактериоид	Опыт 1	Опыт 2	Опыт 3
Экстракт разрушенных бактериоидов	0,10	0,46	0,19
Суспензия целых клеток бактериоидов	1,46	1,52	2,84

Способность бактериоидов гидролизовать сахарозу должна быть связана с процессом азотфиксации. Для проверки этого предположения были поставлены опыты, результаты которых приведены на рисунке. Показано, что в динамике развития растений люпина активность инвертазы, измеренная в суспензии клеток, менялась параллельно интенсивности процесса азотфиксации. От начала измерения до максимума азотфиксации активность инвертазы бактериоидов увеличивалась в 9 раз (при расчете на сухую массу бактериоидов более чем в 12 раз). Это указывает на наличие тесной взаимосвязи между скоростью гидролиза сахарозы бактериоидами и процессом азотфиксации. Расчеты показывают, что по мере развития азотфиксирующую



Изменение интенсивности азотфиксации (1) и активности инвертазы (2) бактериоидов в ходе вегетации люпина

a – активность инвертазы бактериоидов в % от суммы общих активностей инвертаз бактериоидов и цитозоля; *б* – то же в абсолютных единицах

щей системы клубенька и увеличения интенсивности азотфиксации постоянно возрастает соотношение между инвертазой бактериоидов и инвертазой всего клубенька в целом (рис. 1, *a*). В период наиболее интенсивной азотфиксации общая активность нейтральной инвертазы бактериоидов составляет 35–40% от таковой всего клубенька.

Проявление высокой активности в суспензии бактериоидов *R. lupini* и слабой в экстрактах из них наталкивало на мысль о вероятной "поверхностной" локализации инвертазы, которая у грамотрицательных бактерий может быть связана с наружной мембраной или с принадлежностью к перiplазматическому пространству [Beachem, 1979]. Правда, не исключено, что мы имеем дело с растительным ферментом, адсорбированным на поверхности микросимбионта. Часть этих вопросов мы предполагали разрешить с помощью различных методов обработки и разрушения бактериоидов при контроле активности во всех получаемых фракциях.

В табл. 1 представлены результаты 3 опытов, в которых свежевыделенные бактериоиды подвергались действию слабого осмотического шока (подробности опыта можно видеть на схеме). Обычно при такой обработке происходит образование сферопластов, т.е. клеток бактерий с нарушенной фрагментированной внешней мембраной [Тысячная и др., 1984]. Можно видеть, что при осмотическом шоке происходит распределение активности

Схема проведения осмотического шока целых бактериоидов *Rhizobium lupini*



инвертазы между сферопластами, растворимой фракцией (содержанием периплазматического пространства) и фракцией мембран. Нужно подчеркнуть, что разрушение цитоплазматической мембраны при шоке не происходило, поскольку в содержимом периплазматического пространства отсутствовала активность β -оксибутиратдегидрогеназы — маркерного фермента цитоплазмы бактериоидов [Романов, 1977]. Исходя из этого, можно допустить, что осадок мембран (см. схему) представлен в основном фрагментами внешней мембраны бактериоидов.

Во всех 3 опытах картина распределения активности была сходной, при этом наибольшей удельной активностью обладал осадок после ультрацентрифугирования при 200 000 g — фракция отделившихся мембран. Это указывает на то, что инвертаза бактериоидов *R. lupini*, по-видимому, является мембранный-связанным белком. Об этом говорят данные одного из опытов, в котором сферопласти подвергали дальнейшему механическому разрушению в прессе или ультразвуком, затем последующему центрифугированию гомогената: наибольшей удельной активностью обладали фракции частиц (табл. 1).

В табл. 2 приведены результаты опыта, в котором после осмотического шока растворимая фракция (супернатант после 5000 g) подвергалась ультрацентрифугированию различное время 1, 2 и 3 ч. Можно видеть, что при увеличении времени ультрацентрифугирования во фракции мембран происходило накопление белка, удельная активность инвертазы снижалась, а общая почти не менялась; при этом активность инвертазы в супернатанте была невысокой. Эти данные указывают на то, что при осмотическом шоке инвертаза отделяется от бактериоидов главным образом вместе с мембра-

Таблица 1

Распределение активности инвертазы бактериоидов *R. lupini* под действием осмотического шока и последующего разрушения клеток

Фракция	Инвертаза						β -оксибутиратдегидрогеназа, МЕ	
	опыт 1		опыт 2		опыт 3			
	УА	ОА	УА	ОА	УА	ОА		
Целые бактериоиды до осмотического шока (1)	3,6	2736	1,7	2834	8,9	3500	—	
Содержимое перiplазматического пространства (2)	6,4	526	2,6	538	7,0	497	0	
Фракция внешних мембран (3)	19,4	272	10,8	155	15,1	554	—	
Сферопласти бактериоидов (4)	4,4	1748	0,8	1313	5,2	1644	—	
Растворимая фракция бактериоидов, разрушенных в прессе (5)	0,2	19					1,2	
Фракция частиц после разрушения в прессе (6)	2,1	156					—	
Растворимая фракция бактериоидов, разрушенных ультразвуком (7)	0,5	102					0,6	
Фракция частиц после разрушения ультразвуком (8)	3,2	291					—	

Примечание. УА — удельная активность, ОА — общая активность. Удельная активность выражена в наномолях гидролизованной сахарозы в минуту на миллиграммм белка. Фракция 4 была разделена пополам: одну половину разрушали в прессе, другую — ультразвуком (см. схему).

нами, причем наиболее крупными, которые уже осаждаются за первый час ультрацентрифугирования.

Инвертазная активность легко "снималась" с бактериоидов под действием ионной силы. При инкубации бактериоидов в 0,1 М К-фосфатном буфере pH 7,0 при 30° в течение 1 ч и последующем центрифугировании при 5000 g 20 мин 30–40% активности переходило в супернатант. Добавление в инкубационную смесь Mg²⁺ (10 mM) существенно препятствовало отделению активности от мембран, что также указывало на связь инвертазы с мембранами.

Инвертаза, вероятно, связана с внешней мембраной бактериоидов и локализована на ее наружной поверхности. Об этом говорят данные табл. 3, в которой показано, что обработка бактериоидов проназой (комплексом протеолитических ферментов) приводила к резкому снижению или потере инвертазной активности. Электронно-микроскопический контроль при этом не показал заметных структурных изменений. В целом же данные, представленные в табл. 1–3, на наш взгляд, убедительно доказывают, что инвертаза бактериоидов *R. lupini* — мембранный фермент, локализованный на внешней мембране клетки. Это хорошо объясняет высокую

Таблица 2

Распределение инвертазной активности бактероидов *R. lupini* под действием осмотического шока и дальнейшего ультрацентрифугирования

Фракция	Удельная активность, нмоль гидролизованной сахарозы за 1 мин на 1 мг белка	Общая активность Е	Общий белок, мг
Исходная суспензия клеток бактероидов	5,3	5060	962
Центрифугирование суспензии при 5000 g 20 мин			
супернатант*	24,1	5067	210
осадок бактероидов	2,4	1427	605
Ультрацентрифугирование супернатанта при 200 000 g			
в течение 1 ч			
супернатант	2,4	109	46,2
осадок	41,2	229	5,6
в течение 2 ч			
супернатант	0,6	28	50,2
осадок	28,6	209	7,3
в течение 3 ч			
супернатант	0,9	35	40,8
осадок	26,5	215	8,1

*Супернатант перед ультрацентрифугированием при 200 000 g разделили на три равные части.

Таблица 3

Влияние обработки проназой на активность инвертазы бактероидов *R. lupini*

Фракция	Опыт 1			Опыт 2		
	Белок, мг	Удельная активность инвертазы, нмоль гидролизованной сахарозы за 1 мин на 1 мг белка	Общая активность инвертазы, Е	Белок, мг	Удельная активность инвертазы, нмоль гидролизованной сахарозы за 1 мин на 1 мг белка	Общая активность инвертазы, Е
Бактероиды до обработки проназой	426	1,8	749	213	9,3	1982
Отмытые бактероиды после обработки проназой	410	0	0	247	1,7	420

Примечание. Содержание проназы в суспензии бактероидов составляло в 1-м опыте – 2 мг/мл, во 2-м – 0,24 мг/мл.

активность фермента в суспензии целых клеток (табл. 1), а также неудачи других авторов, которые не смогли обнаружить высокую инвертазную активность в экстрактах из бактероидов клубеньков различных бобовых растений [Robertson, Taylor, 1973; Morell, Copeland, 1984].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Кретович В.Л., Калякина Т.И., Казакова О.В. и др. Биосинтез аланина и аспарагиновой кислоты из сахарозы и аммония бактероидами *Rhizobium lupini* // Докл. АН СССР. 1982. Т. 263, № 1. С. 215–218.

Романов В.И. Физиологическая роль и метаболизм полиг- β -оксимасляной кислоты у микроорганизмов // Успехи биол. химии. 1977. Т. 18. С. 211–230.

Тысячник И.В., Фегина В.А., Яковлева В.И., Березин И.В. Методы исследования локализации ферментов в клетках грамотрицательных бактерий // Прикл. биохимия и микробиология. 1984. Т. 20, № 4. С. 435–444.

Федулова Н.Г., Черменская И.Е., Романов В.И., Кретович В.Л. Ферменты обмена полиг- β -оксибутиратов в бактероидах *Rhizobium lupini* // Физиология растений. 1980. Т. 26, № 3. С. 544–548.

Черменская И.Е., Романов В.И., Шведова Т.А., Кретович В.Л. Инвертаза клубеньков желтого люпина // Прикл. биохимия и микробиология. 1984. Т. 20, № 5. С. 612–615.

Beachem J.R. Periplasmic enzymes in gram-negative bacteria // Intern. J. Biochem. 1979. Vol. 10, N 11. P. 877–883.

Kibdy D.K. Activation of plant invertase by inorganic phosphate // Plant Physiol. 1966. Vol. 41, N 7. P. 1139–1144.

Morell M., Copeland L. Enzymes of sucrose breakdown in soybean nodules. Alkaline invertase // Ibid. 1984. Vol. 74, N 4. P. 1030–1034.

Robertson J.G., Taylor M.P. Acid and alkaline invertases in root and nodules of *Lupinus angustifolius* infected with *Rhizobium lupini* // Planta. 1973. Vol. 112, N 1. P. 1–6.

Singh R., Sidhu P.S., Vadhera S. et al. Extracellular invertase of *Rhizobium japonicum* and its role in free sugar metabolism in the developing roots nodules of *Sesbania grandiflora* // Physiol. plant. 1980. Vol. 48. P. 504–508.

Trinchant J.C., Birot A.M., Rigand J. Oxygen supply and energy-yielding substrates for nitrogen fixation (acetylene reduction) by bacteroid preparations // J. Gen. Microbiol. 1981. Vol. 125. P. 159–165.

УДК 631.527

НАПРАВЛЕНИЯ СЕЛЕКЦИИ ЗЕРНОВЫХ БОБОВЫХ КУЛЬТУР НА ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СИМБИОТИЧЕСКОЙ АЗОТФИКСАЦИИ

Н.М. Чекалин

Всесоюзный научно-исследовательский институт
растениеводства им. Н.И. Вавилова, Ленинград

В связи с тем, что планомерной селекции бобовых культур на повышение интенсивности симбиотической азотфиксации (ИСА) до сих пор не проводилось, в литературе нет описания селекционных программ и схем, в которых учитывалась бы оценка селекционного материала по ИСА. Судя по литературным источникам, к настоящему времени накоплено значительное число данных по генетической природе симбиотической азотфиксации, которые могут служить необходимым научным фундаментом для выработки основных направлений селекции бобовых растений на повышение ее интенсивности, так:

а) установлено межсортовое разнообразие у гороха, сои, фасоли, клевера по способности образования клубеньков и нитрогеназной активности при заражении одними и теми же штаммами ризобией;

б) идентифицирован ряд доминантных и рецессивных генов растений, контролирующих устойчивость или восприимчивость к определенным штаммам клубеньковых бактерий [Beringer, Johnston, 1978];

в) получены индуцированные мутанты гороха, устойчивые к образованию клубеньков, обладающие способностью к обильному образованию клубеньков в высококонцентрированной нитратной среде, дефицитные по нитратредуктазе [Jacobsen, 1984];

г) имеются значительные успехи в селекции новых штаммов ризобиев, обладающих способностью к преодолению устойчивости ряда образцов гороха отдаленного происхождения в сочетании с высокой конкурентоспособностью [Берестецкий, Тихонович, 1985].

В предлагаемой статье сделана попытка составления схем и программ селекции зерновых бобовых культур на повышение эффективности симбиотической азотфиксации, не исключая оценки и улучшения по другим важнейшим хозяйствственно-полезным признакам.

Программы селекции составлены с учетом того, что практически все селекционеры страны имеют достаточную площадь помещений искусственного климата (селекционные теплицы, климокамеры).

Нами приводится наиболее общая и простая программа (I) селекции на повышение "неспецифической" азотфиксацией способности бобового растения при инокуляции производственными штаммами или их смесью. Для успешного ее выполнения обязательным является одно условие — наличие, а если его нет, создание полевого участка с минимальным содержанием N для проведения почти всех этапов работы.

Увеличению эффективности инокуляции бобовых растений производственными штаммами препятствует превосходная конкурентная способность содержащихся в почве природных популяций ризобиев. Как уже отмечалось, целый ряд образцов бобовых растений из генетических центров происхождения культур проявляет абсолютную устойчивость к ряду штаммов клубеньковых бактерий в силу дивергентной эволюции. Эта устойчивость контролируется в основном одним рецессивным геном (горох — *sym2*, соя — *gj1*, клевер — *g*). В последнее время удалось отобрать штаммы типа A-1 у гороха, способные не только преодолевать устойчивость афганских образцов, но и вступать в высокозэффективный симбиоз с ними. Штамм A-1 сочетает отличные синтетические свойства азотфиксации с высокой конкурентоспособностью по отношению к производственным штаммам.

Селекционная программа (II) предлагает путем интродукции генов типа *sym2* у гороха получить устойчивые к производственным штаммам изолинии лучших районированных и перспективных сортов с последующим использованием для инокуляции штаммов типа A-1. Далее приведена полная схема программы (II) на примере гороха (табл. 2).

В литературе описаны случаи получения индуцированных мутантов у бобовых растений с целым рядом новых измененных типов взаимодействия с клубеньковыми бактериями, а также реакцией на минеральный азот. В частности, у гороха получены мутанты, устойчивые к образованию

Таблица 1

Программа (I) ускоренной селекции однолетних зерновых бобовых культур (на примере гороха) на повышение ИСА при использовании местных штаммов клубеньковых бактерий

Год, сезон, поле (П), теплица (Т)	Материал, методика работы	Объем работы	Результат
1	2	3	4

1-й этап. Выделение источников с высокой ИСА

1–2-й год, осень, зима, весна, лето, Т, вегетационная площадка, П – безазотный фон	Образцы мировой коллекции ВИР разного происхождения, селекционные номера, мутанты. Сорта оценивают по активности нитрогеназы (АН) ацетиленовым методом. После этого отобранные образцы с максимальной АН оценивают по ИСА способом сухой массы (ССМ) и массе клубеньков и делают окончательный отбор исходного материала, сочетающего АН и ИСА	1–3 тыс. исходных образцов, 5–10% отбор по АН, затем 5–10% отбор по ИСА	В конце 1-го этапа будут отобраны 5–10 источников высокой АН и ИСА с превышением показателей по АН и ИСА районированного сорта
--	--	---	--

2-й этап. Создание рекомбинантов с высокой ИСА и комплексом хозяйствственно-полезных признаков (ХПП)

2-й год, осень, Т	Скрещивание лучших районированных и перспективных сортов и линий с источниками высокой ИСА. Инокуляция ризобиумом может не проводиться. Уборка по комбинациям скрещивания	25–30 комбинаций: по каждой комбинации не менее 25–50 гибридных семян	Получены гибридные семена F_1
2–3-й год, зима, весна, Т	Выращивание растений без отборов в комфортных условиях с целью получения максимального количества семян с каждого растения. Уборка по комбинациям	20–40 растений по каждой комбинации, всего 500–600	Получены гибридные семена F_2
3-й год, лето, П	<p>Семена F_2 высеваются в поле на безазотном или очень бедном по азоту, лучше инфекционном фоне по наиболее вредоносным болезням, с предварительной инокуляцией эффективными штаммами клубеньковых бактерий</p> <p>В качестве стандарта высеваются районированный сорт. Среди нормально развитых, fertильных растений проводят жесткий глазомерный отбор по комплексу ХПП. Уборка по растениям, причем часть семян с каждого растения используют для зимних опытов в теплице, часть оставляют в резерве для весеннего посева в поле</p>	<p>По каждой комбинации высеваются от нескольких сот до нескольких тысяч растений</p> <p>2. После отбора остается не менее 2 тыс. растений</p>	<p>Отобраны рекомбинанты с нормальным фенотипом по комплексу хозяйствственно-полезных признаков</p>

Таблица 1 (продолжение)

1	2	3	4
3–4-й год, осень, зима, весна, Т	Опыт 1. Часть семян F_3 с каждого отобранного растения F_2 используют для посева в сосудах для определения ИСА по ССМ, массе клубеньков и АН при инокуляции производственным штаммом. Для дальнейшей работы отбирают семьи, сочетающие высокие показатели по ИСА при всех методах определения	10 семян с каждого растения: всего анализируют 2 тыс. семей и 20 тыс. растений	Получены оценки всех отобранных семей F_3 по ИСА и АН и отобраны лучшие семьи
3–4-й год, зима, весна, Т	Опыт 2. ОСП (1 семя на потомство). По 1 семени из лучших по ИСА по оценке в опыте 1 потомства отдельных растений F_3 высевают для получения семян F_4 и гомозиготизации гибридного материала. Каждое растение этикуируется для последующего сличения с семьями F_3	В течение зимне-весеннего сезона выращивают 400–500 растений	Получены семена F_4 растений с высокими оценками по ИСА
4-й год, лето, П	Семьи F_3 из резерва семян урожая прошлого года и их потомства F_4 из ОСП высевают чередующимися рядками на бедном по азоту участке на инфекционном фоне и проводят глазомерный отбор семей по комплексу ХПП и выравненности, а также отбор отдельных растений из расщепляющихся семей для рекуррентной селекции	Высевают 400–500 семей F_3 и 400–500 семей F_4 . Отбирают для последующей работы 60–70 семей F_4 и 400–500 растений F_3 и F_4	Из семей, отобранных по высокой ИСА, повторно отобраны семьи, сочетающие желательный комплекс ХПП и ИСА
4–5-й год, осень, зима, весна	Оценка у отобранных семей (линий) F_5 и растений F_4 и F_5 ИСА по сухой массе (ССМ), массе клубеньков и АН, отбор линий с максимальной ИСА	60–70 семей F_5 (линий) и 400–500 растений F_4 и F_5	1. Окончательный отбор линий с высокой ИСА. 2. Повторный отбор растений для рекуррентной селекции
5–8-й год, П	1. Контрольное (КП), предварительное, конкурсное (КСИ), экологическое, производственное и государственное (ГСИ) сортоиспытание проводится по стандартным или ускоренным методикам на 2 фонах – бедном (1) и нормальном (2) по N. Отбирают линии, показавшие максимальный урожай на фоне 1 и не уступающие стандартному сорту в варианте 2. На всех этапах сортоиспытания, перв-	От 60–70 линий в КП до 8–10 в КСИ и 1–2 в ГСИ	Выведены сорта зерновых бобовых культур, сочетающие высокую ИСА с урожайностью, качеством, устойчивостью к болезням и неблагоприятным фактам

Таблица 1 (окончание)

1	2	3	4
	вичного семеноводства проводит- ся жесткий контроль стабильности высокой ИСА		рам среды, приспособлен- ные к возде- лыванию по интенсивным технологиям, способные обеспечивать высокий уро- жай без внесе- ния минераль- ных азотных удобрений
5-й год, лето, П	2. Испытание потомств отдель- ных растений (рекуррентная селек- ция)	400–500 семей F_5 и F_6	Окончательный отбор линий с высокой ИСА
<p><i>Примечание.</i> Программа составлена на примере селекции гороха, по которому имеется большой опыт (ВНИИЗБКК и др.) по выращиванию в год 4 поколений; 3 в теплице и 1 в поле. По другим культурам, например сое, люпину, фасоли, нуту, за зимний период получают 2 поколения. Следовательно, сроки работы на 1/3 увеличиваются.</p>			

клубеньков (K_5 и K_9), другой мутант E_1 оказался дефицитным по нитратредуктазе, а третий под₃ проявил способность к обильному образованию клубеньков в высококонцентрированной нитратной среде [Jacobsen, 1984]. Последние 2 типа мутантов представляют большой интерес для селекции, так как при их выращивании на особо бедном или богатом по N фоне они нормально фиксируют атмосферный азот и сохраняют имеющийся запас его в почве для последующих культур или злаковых, выращиваемых с бобовыми в смеси. Испытание индуцированных мутантов в разных почвенно-климатических средах и при инокуляции различными штаммами ризобий может вызвать выгодные хорошо совместимые комбинации макро- и микросимбионта, приспособленные к данным условиям.

Схемы и методы использования радиационного и химического мутагенеза на бобовых хорошо известны и многократно описаны множеством авторов, но при селекции на ИСА имеются некоторые принципиальные ограничения, без соблюдения которых работа может оказаться безрезультатной.

1. Вся работа, начиная с поколения M_2 , должна проводиться на специальном участке, бедном по азоту.

2. Для выделения мутантов, дефицитных по нитратредуктазе типа E_1 у гороха, испытание мутантных смесей нужно проводить на фоне бертолетовой соли (хлората калия).

3. Программа работ должна предусматривать подбор штаммов бактерий для инокуляции.

В целом при создании мутантных сортов с повышенной ИСА при заражении производственными штаммами программа селекции и ее этапы ана-

Таблица 2

Программа (II) селекции сортов бобовых культур, устойчивых к местным популяциям и избирательно восприимчивых к производственным штаммам клубеньковых бактерий

Год, сезон, поле (П), теплица (Т)	Материал, методика работы	Объем работы	Результат
1	2	3	3
1-й год, осень, Т	Скрещивание лучших районированных и перспективных сортов (А) с афганскими образцами, устойчивыми к штамму 250А (В). А × В → АВ. Посев родительских форм на фоне минерального азота	5–6 комбинаций скрещивания; в каждой получают по 50 гибридных семян	Получены семена F_1
1-й год, зима, Т	Посев гибридов F_1 и сортов (А) на фоне минерального азота. 1-й беккросс: F_1 (АВ) × А → $F_1 B_1$ (2АВ)	5–6 комбинаций беккроссов по 50 гибридных семян	Получены семена $F_1 B_1$
2-й год, весна, Т	Посев гибридов (2АВ) на фоне минерального азота без скрещивания. В этом поколении расщепление по гену <i>sym2</i> не происходит. Отбор и скрещивание не производится	По каждой комбинации выращивают 40–50 растений	Получены семена $F_2 B_1$
2-й год, лето, П	1. Посев гибридов $F_2 B_1$ на безазотном фоне с инокуляцией производственным штаммом, к которому устойчив образец В. Все растения, гомозиготные по гену <i>sym2</i> , приобретут желтую окраску. Ожидаемое расщепление на зеленые и желтые растения 6:1. После удаления всех зеленых растений на участок вносят минеральный азот, чтобы получить нормальную fertильность у устойчивых рекомбинантов 2. Скрещивание устойчивых рекомбинантов, наиболее близких по фенотипу к исходным сортам (А) снова с этими же сортами (А). 2-й беккросс: 2АВ × А → 3АВ	По каждой комбинации высевают не менее 250–500 растений, а после негативного отбора остается по 30–60 растений	Отобраны рекомбинанты, гомозиготные по рецессивному гену <i>sym2</i>
2-й год, осень, Т	Посев гибридов $F_2 B_2$. 3-й беккросс: 3АВ × А → 4АВ	5–6 комбинаций по 50 гибридных семян	Получены семена $F_2 B_2$
2–3-й год, зима, весна, Т	Посев гибридов $F_2 B_3$ (4АВ) на фоне минерального азота. Отбор и скрещивание не производятся	50 гибридных семян в каждой комбинации	Получены семена $F_2 B_3$
3-й год, лето, П	Посев гибридов (4АВ) на безазотном фоне с инокуляцией производственным штаммом. Удаление всех зеленых растений и последующая подкормка минеральным азотом. Гибридизация больше не проводится. Для дальнейшей работы визуально отбирают устойчивые к производственному штамму растения, фенотипически аналогичные исходным сортам А. Программа создания устойчивых изолиний на этом закончена	4–6-й года	Дальнейшая работа заключается в испытании полученных изолиний лучших сортов и их совместимости с различными штаммами клубеньковых бактерий типа А-1, способных к эффективному симбиозу в присутствии генов типа <i>sym2</i> у гороха

Таблица 2 (окончание)

1	2	3	4
		щая подкормка минеральным азотом. Гибридизация больше не проводится. Для дальнейшей работы визуально отбирают устойчивые к производственному штамму растения, фенотипически аналогичные исходным сортам А. Программа создания устойчивых изолиний на этом закончена	производственному штамму растений, по фенотипу аналогичных сортам А

Из 30–40 устойчивых изолиний получены сорта нового типа, не реагирующие на местные популяции ризобий, но вступающие в эффективный симбиоз со штаммами типа А-1

логичны программе (I), за исключением программы гибридизации. Вместо образцов мировой коллекции по ИСА оцениваются этими же методами мутанты M_2 . Отобранные мутанты со стабильно высокой ИСА далее используются или как исходный материал для гибридизации, или в сортоиспытании как новые мутантные линии и сорта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Берестецкий О.А., Тихонович И.А. Повышение эффективности биологической фиксации азота за счет селекции бобовых по признакам симбиоза // Докл. ВАСХНИЛ. 1985. Т. 6. С. 9–11.
 Beringer J.E., Jonston A.W.B. The genetics of the *Rhizobium-legume* symbiosis // Izotopes in biological dinitrogen fixation. Vienna: IAEA, 1978. P. 27.
 Jacobsen E. Modification of symbiotic of pea (*Pisum sativum* L.) and *Rhizobium leguminosarum* by induced mutations // Plant and Soil. 1984. Vol. 82, N 3. P. 427–440.

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Е.Н. Мишустин, Н.И. Черепков.</i> Значение биологического азота в азотном балансе и повышении плодородия почв СССР	3
I. СИМБИОТИЧЕСКАЯ ФИКСАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА	
<i>Е.П. Трепачев, Л.Д. Алейникова.</i> О вкладе биологического азота бобовых в плодородие почвы	8
<i>А.П. Кожемяков.</i> Приемы повышения продуктивности азотфиксации и урожая бобовых культур	15
<i>Л.М. Доросинский.</i> Конкурентная способность клубеньковых бактерий	27
<i>В.В. Бузмаков.</i> Влияние биологического азота люпина на продуктивность сеяночного оборота	34
<i>Г.С. Посьпанов.</i> Факторы, определяющие эффективность азотфиксации бобовыми культурами	37
<i>Д.Г. Звягинцев, П.А. Кожевин, М.Е. Додзин, Л.М. Полянская.</i> Регуляция численности клубеньковых бактерий в почвах	40
<i>В.К. Шильникова.</i> Процесс инфицирования бобового растения клубеньковыми бактериями	46
<i>Г.Я. Жизневская, Е.Я. Федорова.</i> Симбиотическая азотфиксация в неблагоприятных условиях	52
<i>Л.Н. Пароменская.</i> Симбиотическая фиксация азота при применении химических средств защиты растений	60
<i>С.В. Добрица.</i> Актинориза и ее роль в биологической азотфиксации	68
<i>Г.С. Муромцев, Г.Н. Маршунова.</i> Эндомикориза бобовых культур	81
II. АССОЦИАТИВНАЯ ФИКСАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА	
<i>Л.Ф. Васюк.</i> Азотфиксирующие микроорганизмы на корнях небобовых растений и их практическое использование	88
<i>Л.В. Кравченко.</i> Энергетические затраты на ассоциативную азотфиксацию и их обеспечение в ризосфере небобовых растений	99
<i>В.Н. Кудеяров.</i> Оценка размеров несимбиотической азотфиксации в различных почвах СССР	109
<i>М.М. Умаров, О.Б. Коновалова, В.П. Шабаев.</i> Азотфиксация и денитрификация в агросистемах на серых лесных почвах	116
<i>В.Т. Емцев, М.И. Чумаков, М.Х. Брук.</i> Об ассоциативном симбиозе <i>Clostridium</i> с высшими растениями	124
<i>Т.В. Редькина.</i> Механизм положительного влияния бактерий рода <i>Azospirillum</i> на высшие растения	132
<i>И.К. Кравченко.</i> Метан и водород как источники энергии для почвенных азотфиксаторов	141

<i>Е.М. Панкратова</i> , Азотфиксирующие цианобактерии и их экология в пахотных почвах умеренной зоны	147
<i>Т.А. Калининская, Ю.М. Миллер</i> . Использование изотопа ^{15}N при изучении не-сymbiotической азотфиксации	156
III. ГЕНЕТИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ЭВОЛЮЦИОННО-ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АЗОТФИКСАЦИИ	
<i>И.А. Тихонович</i> , Использование генетических факторов микросимбионта для повышения биологической азотфиксации	166
<i>А.А. Аронштам, Б.В. Симаров</i> , Молекулярно-генетические механизмы детерминации симбиотических свойств клубеньковых бактерий	181
<i>И.Е. Черменская, З.Н. Цагурия, В.И. Романов, В.Л. Кретович</i> . Инвертаза бактериоидов <i>Rhizobium lupini</i>	193
<i>Н.М. Чекалин</i> , Направления селекции зерновых бобовых культур на повышение эффективности симбиотической азотфиксации	199

Научное издание

**БИОЛОГИЧЕСКИЙ АЗОТ
В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ
СССР**

Утверждено к печати
Институтом микробиологии АН СССР

Редактор *И.А. Типисеева*
Художественный редактор *М.Л. Храмцов*
Технический редактор *Г.П. Каренина*
Корректор *Т.И. Шеповалова*

Набор выполнен в издательстве
на наборно-печатывающих автоматах

ИБ № 37598

Подписано к печати 09.12.88. Т-23304
Формат 60 X 90 1/16. Бумага для глубокой печати
Гарнитура Пресс-Роман. Печать офсетная
Усл.печ.л. 13,0. Усл.кр. отт. 13,4. Уч.-изд.л. 15,9
Тираж 950 экз. Тип зак. 995. Цена 3р. 20к.

Ордена Трудового Красного Знамени
издательство "Наука"
117864 ГСП-7, Москва В-485,
Профсоюзная ул., д. 90

Ордена Трудового Красного Знамени
1-я типография издательства "Наука"
199034, Ленинград В-34, 9-я линия, 12

3 р. 20 к.