

## МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ СИМБИОТИЧЕСКОГО АППАРАТА БОБОВЫХ КУЛЬТУР В ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ

Г. С. ПОСЫПАНОВ

(Кафедра растениеводства ТСХА)

Для получения объективных сопоставимых результатов исследования симбиотического аппарата разных бобовых культур необходимо иметь единую методику.

Корневую систему с клубеньками, как правило, извлекают методом монолитов. Однако до настоящего времени нет рекомендаций, какими должны быть размеры монолита почвы для различных культур, каков объем репрезентативной выборки, как проводить отмывку корневой системы и учет количества и массы клубеньков. Недостаточно полно разработан метод определения нитрогеназной активности симбионтов для полевых условий, требует усовершенствования методика определения концентрации леггемоглобина в клубеньках и ряд других методов.

В процессе длительного изучения формирования и активности симбиотического аппарата зерновых бобовых культур и многолетних бобовых трав мы использовали многие из имеющихся методик, некоторые из них были модифицированы нами, некоторые разработаны заново. В этом сообщении сделана попытка привести в единую систему методики определения показателей симбиотического аппарата различных культур.

### Определение размеров симбиотического аппарата

Клубеньки бобовых культур — это сложная азотфиксирующая система, включающая гипертрофированную ткань корня с бактериальными клетками, содержащую леггемоглобин и ферментативный комплекс как продукты симбиоза. В биологической фиксации азота косвенное (но очень важное) участие принимает сама корневая система, по которой в клубеньки поступает энергетический материал, вода и элементы минерального питания. Часть корневой системы с расположенными на ней клубеньками мы называем симбиотическим аппаратом. Размещение клубеньков по корневой системе у различных культур неодинаковое. У одних они концентрируются у главного корня ближе к поверхности почвы, у других — дисперсно расположены по корневой системе. Следовательно, чтобы полностью извлечь симбиотический аппарат, необходимо знать особенности размещения клубеньков по корневой системе у разных видов культур, и на этом основании рассчитать размеры монолита. Чтобы данные о размерах симбиотического аппарата были достоверными, необходимо обеспечить репрезентативность выборки.

Определение размера монолита. В полевых опытах с люпином узколистным и желтым, соей, фасолью, кормовыми бобами, горохом, люцерной, клевером луговым и лядвенцем рогатым в 1967—1982 гг. наряду с другими вопросами мы изучали размещение клубеньков по корневой системе. В 1980—1982 гг. на Опытной станции полеводства нами были проведены специальные полевые опыты с 13 видами зерновых бобовых культур [6], с 10 видами бобовых трав, в том числе 7 многолетними, 2 двухлетними и, для сравнения, одной однолетней культурой. Перед посевом семена обрабатывали специфичными вирулентными активными штаммами клубеньковых бактерий. Почва опытного участка дерново-подзолистая среднесуглинистая,  $pH_{\text{сол}}$  6,0—6,8, содержание гумуса — 2,1—2,5%,  $P_2O_5$  — 8—18,  $K_2O$  — 16—22,

$N_{лг}$  — 4—8 мг на 100 г почвы, глубина пахотного слоя 25 см. Повторность опыта 4-кратная, размещение культур рендомизированное, площадь делянки 10—25 м<sup>2</sup>. Для удобства учета клубеньков культуры высеивали широкорядным способом.

При изучении вертикального размещения клубеньков по корневой системе в фазу цветения отбирали монолиты почвы диаметром 50 см по слоям 0—5, 5—10, 10—15, 15—20 и 20—25, в некоторых случаях — 25—30, 30—35, 35—40, 40—45, 45—50, 50—55 см. Корни с клубеньками каждого слоя почвы отмывали на ситах с отверстиями диаметром 1 мм. Иловатые частицы с клубеньков и корней удаляли мягкой кисточкой под струей воды. Клубеньки отделяли от корней, те и другие высушивали фильтровальной бумагой. Взвешивали отдельно корни, клубеньки, содержащие леггемоглобин и не содержащие его.

Для определения горизонтального размещения клубеньков в ту же фазу брали монолиты 50×50 см на глубину распространения клубеньков. Монолиты помещали в воду на 12 ч и осторожно отмывали от почвы струей воды на ситах с отверстиями 1 мм. Корневую систему с клубеньками размещали на бумаге, стараясь сохранить естественное расположение корней. Корни других растений, попавшие в монолит, удаляли. Затем последовательно обрезали и анализировали корни, входящие на вертикальные слои 25—15 см от главного корня; 15—10; 10—5; 5—2; 2—0 см и, наконец, определяли количество и массу клубеньков, расположенных на главном корне. Повторность 5—6-кратная.

Поскольку отделение клубеньков от корневой системы требует значительного времени (особенно у таких культур, как клевер), то, чтобы предотвратить их подсыхание и избежать ошибки в определении массы, клубеньки собирали в чашку Петри на мокрую фильтровальную бумагу. Перед взвешиванием их подсушивали фильтровальной бумагой.

Анализ симбиотического аппарата позволил нам выделить пять групп бобовых культур, различающихся характером размещения клубеньков на корневой системе и соответственно размерами монолита почвы (таблица).

В I группу вошло 9 видов, из них 4 зерновые бобовые культуры и 5 видов многолетних бобовых трав, у которых клубеньки дисперсно расположены по корневой системе в радиусе 15—18 см от главного корня и на глубину до 25—27 см. Они, как правило, размещаются по одному или небольшими группами. 60—95 % клубеньков расположено в слое 0—15 см, но часть их образуется на глубине до 25—27 см. У эспарцета, люцерны рогового, люпина многолетнего 75—97 % клубеньков находится в радиусе до 10 см от главного корня, а отдельные мелкие клубеньки встречаются на глубине 40—55 см. Следовательно, для изучения в полевых условиях симбиотического аппарата культур этой группы монолиты должны быть радиусом 15—18 см от главного корня растения и глубиной не менее 25—27 см.

Ко II группе относятся люпины узколистный, желтый и белый, у которых 60—90 % клубеньков находится на главном корне, остальные — в радиусе до 12 см. Глубина проникновения такая же, как и у культур I группы. В связи с этим радиус монолита можно уменьшить до 10—12 см.

В III группу вошли культуры, у которых клубеньки проникают не глубже 20—23 см при радиусе распространения 15—17 см.

Группа IV включает 5 однолетних культур с достаточно компактным симбиотическим аппаратом; 80—97 % клубеньков у них расположено в радиусе до 5 см и на глубине до 10 см. Радиус монолита можно уменьшить до 15 см, а глубину — до 15—17 см.

К V группе отнесены культуры с самым компактным симбиотическим аппаратом. Шаровидные клубеньки этих культур размещены в слое до 10—12 см при радиусе до 12 см.

Такое размещение клубеньков по корневой системе бобовых культур наблюдалось в условиях, благоприятных для симбиоза. При неблагоприятных условиях горизонтальное размещение клубеньков несколь-

**Классификация бобовых культур по размещению клубеньков на корневой системе  
(дерновоподзолистые почвы)**

Культура	Размещение в слое почвы, % от общей массы клубеньков				Границы распространения клубеньков, см	
	горизонтальное, см		вертикальное, см			
	0—5	0—15	0—10	0—20	радиус	глубина
<b>Г р у п п а I</b>						
Горох посевной	58	99	71	98		
Горох полевой	50	100	60	88		
Вика посевная	74	99	66	91		
Вика мохнатая	53	98	82	98		
Люцерна изменчивая	39	98	51	85		
Клевер ползучий	68	99	71	90		
Ляденец рогатый	67	99	79	98		
Люпин многолетний	53	91	83	98		
Эспарцет виколистный	72	99	40	77	18	27
<b>Г р у п п а II</b>						
Люпин узколистный	81	100	72	96		
Люпин желтый	87	100	70	98		
Люпин белый	98	100	78	97	12	27
<b>Г р у п п а III</b>						
Клевер луговой	61	96	88	96		
Клевер гибридный	47	95	77	97		
Донник белый	56	99	84	99		
Донник желтый	65	100	94	100	17	23
<b>Г р у п п а IV</b>						
Бобы кормовые	87	100	90	100		
Чина посевная	94	100	82	99		
Чечевица	81	100	87	100		
Нут	83	100	96	100		
Сераделла	97	100	88	99	12	17
<b>Г р у п п а V</b>						
Фасоль	52	100	97	99		
Соя	95	100	99	100	12	12

ко изменяется. Если весной выпадает мало осадков и влажность почвы в мае опускается ниже критического минимума (50 % ППВ), клубеньки на главном корне не образуются. После выпадения осадков они появляются на боковых корнях, и тем дальше, чем продолжительнее был засушливый период. Но максимальное удаление их не выходит за пределы, характерные для данной группы культур. При этом глубина образования нижних клубеньков не изменяется.

На тяжелых почвах или в условиях переувлажнения клубеньки практически всех культур концентрируются в верхнем 3—5 см слое при том же радиусе распространения. На легких почвах и в годы с недостаточной влажностью основная масса их формируется у нижней границы распространения. На кислых бедных почвах формируются единичные клубеньки или они совсем не образуются. Известкование кислых почв, повышенная обеспеченность фосфором, калием и бором способствуют значительному увеличению массы клубеньков [3—5].

Азотные удобрения задерживают образование клубеньков и тем дольше, чем выше доза азота [2]. При внесении минерального азота в

дозах 70—165 кг/га образование клубеньков задерживается до бутонизации — цветения, а при 200—370 кг/га — до налива семян. В этих случаях клубеньки также образуются по периметру границы, свойственной данной группе культур. Как правило, клубеньки, образовавшиеся с запозданием, мелкие и функционируют короткое время.

### Учет симбиотического аппарата в широкорядных и сплошных посевах

В полевых опытах иногда необходимо знать массу клубеньков бобовых культур в расчете на гектар. Ее можно определить по массе клубеньков на растение и густоте стояния растений, а также по массе клубеньков на единицу площади.

Для культур рядового и узкорядного посева наиболее удобным является метод пересчета на площадь. Для этого металлическую рамку  $300 \times 167$  мм ( $0,05$  м<sup>2</sup>) размещают так, чтобы в рамку попадали 2 ряда при рядовом посеве, 4 — при узкорядном, а короткие боковые грани рамки приходились на середину междурядий. Высота монолита должна соответствовать глубине распространения клубеньков изучаемой культуры. В этом случае в монолит попадают корни с клубеньками не только растений, находящихся в рамке, но и соседних, а часть корней с клубеньками учитываемых растений оказывается вне монолита.

Корни с клубеньками отмывают от почвы и учитывают массу всех клубеньков монолита. Зная площадь монолита и среднюю густоту стояния растений, можно определить массу клубеньков на гектаре или на растение.

Массу клубеньков на гектаре  $M$  рассчитывают по формуле  $M = 10 m/S$ , где  $m$  — масса клубеньков в монолите, г;  $S$  — площадь монолита, м<sup>2</sup>; 10 — коэффициент пересчета с г/м<sup>2</sup> в кг/га.

Если площадь монолита равна  $0,05$  м<sup>2</sup>, то  $M = 200 m$ .

В том случае, когда травостой невыравненный, сначала устанавливают коэффициент выравнивания. Например, суммарная площадь, не занятая бобовыми культурами (выпады), составляет 30 %, коэффициент выравнивания — 0,7. С поправкой на выравнивание формула примет вид:  $M = 10 mk/S$ , где  $k$  — коэффициент выравнивания.

Широкорядно, с междурядьями 45 см, обычно высевают сою, фасоль, режу — кормовые бобы и люпин белый. При этом междурядье в монолит площадью  $0,1$  м<sup>2</sup> войдет часть ряда длиной 22,2 см. Поскольку диаметр распространения клубеньков сои и люпина не превышает 25 см, а кормовых бобов — 30 см, ширину монолита, не снижая точности опыта, можно сократить с 45 соответственно до 25 и 30 см. Площадь такого монолита будет равна  $0,1$  м<sup>2</sup> и  $M = 100 m$ , кг/га. При междурядье 70 см длина ряда в монолите при площади последнего  $0,1$  м<sup>2</sup> составит 14,3 см.

Для расчета массы клубеньков на растение необходимо среднюю массу клубеньков монолита разделить на среднюю густоту стояния.

Репрезентативный объем выборки. При определении размеров и активности симбиотического аппарата посева важно знать, какое количество монолитов достаточно точно отражает действительное состояние посева, т. е. каков репрезентативный объем выборки.

В специальных опытах, которые проводились в различные фазы развития растений в разные по метеорологическим условиям годы, были проанализированы по 100—200 растений. Каждое растение исследовали отдельно. Математическая обработка данных показала, что коэффициент вариации для надземной части растений сои с фазы цветения становится почти стабильным (около 50 %) при выборке 30—40 растений. Для массы корней и клубеньков кривая коэффициента вариации выходит на плато на уровне 50 % при выборке 20—30 растений. Таким образом, выборка 40 растений вполне репрезентативна для надземной массы растений, корней и клубеньков.

Количество монолитов определяется густотой стояния растений, объемом выборки и площадью монолита. При густоте стояния сои 400 тыс/га и площади монолита 0,1 м<sup>2</sup> необходимо отобрать 8 монолитов, т. е. по 2 в каждой повторности. На достаточно выравненных посевах их количество может быть снижено до 6.

Для культур сплошного посева с высокой густотой стояния, где в одном монолите площадью 0,05 м<sup>2</sup> размещается 8—10 растений, количество монолитов не должно быть менее 6 во избежание снижения уровня репрезентативности.

При изучении динамики формирования симбиотического аппарата растительные образцы приходится брать часто — через 7—10 дней.

Для культур широкорядного посева с компактным симбиотическим аппаратом отбор монолитов можно упростить. Лопаткой выкапывают монолит с обеих сторон рядка на расстоянии 12—13 см от растения. В один монолит отбирают 3—4 растения. Длина монолита должна быть такой, чтобы расстояние от ближайшего учитываемого растения до конца монолита было не менее радиуса распространения клубеньков. Растения, оказавшиеся в этой зоне, при отмывке удаляются из монолита и в учет не включаются.

### Определение активности нитрогеназы в полевых условиях

Ацетиленовый метод определения активности нитрогеназы, предложенный Р. В. Харди [12, 13], благодаря высокой чувствительности и сравнительной простоте находит все большее распространение. Как известно, метод основан на способности ферментного азотфиксирующего комплекса — нитрогеназы — восстанавливать ацетилен до этилена. Восстановление идет в соотношении  $N_2 : C_2H_2 = 1 : 3$  [12, 17]. Он широко используется для определения нитрогеназной активности у свободноживущих азотфиксаторов [14, 18] и клубеньков, отделенных от растения [11]. Ведутся разработки по использованию его для определения нитрогеназной активности бобовых культур в полевых условиях без извлечения растений из почвы. Такая методика описана в работе М. М. Умарова [9]. Она заключается в следующем. На растения надевается металлический цилиндр (в виде обруча) со съёмным колпаком из полиэтиленовой пленки. Цилиндр погружают в почву на глубину 10 см до упора в кольцевую канавку. Внутри цилиндра на почву ставится бюкс с 25—30 г карбида кальция, который служит генератором ацетилена. На металлический обруч натягивают полиэтиленовый колпак, а в кольцевую канавку цилиндра наливают воду для создания водного затвора. В бюкс с карбидом кальция наливают воду и цилиндр накрывают колпаком, обруч которого погружается в воду кольцевой канавки. Внутри колпака через резиновую пробку шприцем вводится определенное количество пропана как метка объема и отмечается время начала инкубации. Продолжительность инкубации от 1—2 до 12—24 ч в зависимости от задачи и условий опыта.

По окончании инкубации шприцем отбирают газовые пробы по 15 мл и вводят во флаконы из-под пенициллина, из которых предварительно был откачан воздух. Затем из них берут пробу для газохроматографического анализа. Размеры азотфиксации вычисляют в мг азота на 1 м<sup>2</sup>.

Однако этот метод требует некоторых уточнений. Так, не определены оптимальные площади металлического сосуда для различных бобовых культур, не выяснено влияние места отбора газовой пробы, не установлена оптимальная экспозиция для почв разного механического состава и различной влажности.

Мы поставили своей целью определить оптимальную площадь цилиндра для культур, различающихся по морфологии симбиотического аппарата. Так, для культур, посев которых производят рядовым и узкорядным способами, размеры сосуда составляют 167×300 мм, для сои, фасоли и кормовых бобов — 222×250 мм (обоснование площади при-

ведено выше). При установке металлического сосуда в поле на культурах сплошного посева в сосуд должны войти 2 рядка при рядовом и 4 — при узкорядном посевах, длина рядка 167 мм, боковые грани идут по середине междурядий. На широкорядных посевах сосуд следует разместить длинной стороной поперек рядка так, чтобы рядок шел по его середине. В противном случае часть клубеньков окажется вне сосуда и пересчет на площадь будет неправомерен.

Глубина металлического сосуда должна соответствовать размещению основной массы клубеньков. На тяжелых и переувлажненных почвах заглублять сосуд следует не более чем на 10 см, так как в этих условиях основная масса клубеньков всех культур находится в верхнем слое.

При работе с соей или фасолью, имеющими компактный симбиотический аппарат, можно использовать сосуд высотой 10 см.

Высота колпака из полиэтиленовой пленки должна соответствовать высоте растений, необходимо, чтобы они достаточно свободно в нем размещались. Колпаки обязательно проверяют на герметичность водой. Негерметичные колпаки непригодны для анализа.

Количество карбида кальция должно быть достаточным для обеспечения концентрации ацетилена в инкубируемом объеме на уровне 5—10 %. Для указанных размеров цилиндра и высоты колпака 60—70 см оно равно 35—40 г. В качестве метки объема в сосуд указанных размеров вводится 20 мл пропана. При меньшем объеме пропана его концентрация к концу анализа становится очень низкой.

Для определения места отбора газовой пробы мы провели специальные опыты. Резиновые пробки устанавливали в низу, в середине и в верху колпака. Высота колпака 80 см. Наблюдения проводили в полевых опытах на инокулированной и неинокулированной сое. Повторность 4-кратная. Пробу газовой смеси отбирали шприцем на 10 мл с силиконовым кольцом на поршне через 1; 1,5 и 3 ч одновременно со всех уровней в 3-кратной повторности, стараясь не перемешивать воздух внутри колпака. Пробу газа вводили в пузырек из-под пенициллина, из которого был откачан воздух (пузырек был закрыт резиновой пробкой на эпоксидной смоле). Результаты опыта показали, что диффузия газов идет достаточно быстро. Количество этилена в пробах различного уровня было практически одинаковым. Например, в одной повторности оно составило в верху колпака 8,55, в середине — 8,61, в низу — 8,61 мг/ч на сосуд; в другой повторности с меньшей массой клубеньков — соответственно 3,99; 3,69 и 4,05 мг/ч. На неинокулированной сое во всех повторностях и на всех уровнях оно равнялось 1,23 мг/ч на сосуд (за счет свободноживущих азотфиксаторов).

Таким образом, место отбора газа из полиэтиленового колпака не имеет значения.

Важно отметить, что использованные для отбора газа пузырьки необходимо промывать водой. Продувание воздухом при помощи шприцев не обеспечивает их чистоты, и при повторном использовании результаты опыта могут быть искажены.

### Определение содержания леггемоглобина в клубеньках

А. Виртанен [19—21] обнаружил тесную корреляцию между концентрацией леггемоглобина (Лб) и количеством симбиотически фиксированного азота воздуха. В его опытах затенение сои даже на 2—3 дня вызывало изменение окраски клубеньков от красной до бурой, а впоследствии они приобретали зеленый цвет. Он установил, что содержание Лб является критерием активности штамма *Rhizobium*. Как показали фундаментальные исследования Смита [15, 16], Лб присутствует только в активных клубеньках. Этот факт был подтвержден рядом других исследователей [1].

Окраска клубеньков, определяемая содержанием Лб, может быть индикатором активности симбиоза. По ней в полевых условиях можно

определять активность симбиоза без использования инструментальных методов.

Установлено, что различные культуры при одинаковых условиях выращивания имеют разную концентрацию Лб [19]. В связи с этим изучение содержания Лб у разных культур при различных условиях выращивания представляет теоретический и практический интерес.

Выделение Лб из водных экстрактов свежесобранных клубеньков чаще всего проводят методом адсорбционной хроматографии на колонках окиси алюминия [10].

Анализ содержания Лб можно разделить на 3 этапа: подготовка прибора, подготовка клубеньков для анализа, выделение и расчет содержания Лб в клубеньках.

**Подготовка реактивов и прибора.** В качестве адсорбента применяют активированную окись алюминия. Активация ее проводится следующим образом. Окись тщательно отмывают водопроводной водой до полного удаления пылеватых частиц. Затем ее обрабатывают крепкой серной кислотой и многократно отмывают водопроводной водой до нейтральной реакции. Слив воды проводится методом декантации. Далее адсорбент обрабатывают 1% раствором NaOH и вновь отмывают водой до нейтральной реакции. Приготовленная таким образом окись алюминия хранится под слоем воды.

В качестве элюирующего средства применяют полунасыщенный раствор сульфата аммония (рН 8,0).

При определении концентрации Лб в клубеньках в зависимости от условий выращивания нередко приходится анализировать малые количества клубеньков. Как показали наши опыты, для этого лучше подходят уменьшенные хроматографические колонки. Мы применяем колонки диаметром 6—8 мм с высотой столба адсорбента 100 мм.

**Заполнение колонки.** В нижнюю оттянутую часть трубки помещают рыхлый тампон ваты и колонка заполняется водной суспензией окиси алюминия при вакууме, создаваемом водяным насосом. Необходимо обеспечить полную герметичность кранов и соединений прибора. Затем колонку промывают водопроводной водой для удаления частиц адсорбента, прошедших через вату. На поверхности окиси алюминия всегда должен быть слой воды. По окончании промывания прибор отключают от насоса, сборную камеру промывают водой.

**Подготовка клубеньков к анализу.** При одновременном изучении нитрогеназной активности и содержания Лб следует использовать одни и те же растения. Отбор проб и отмыв корневой системы проводят описанным выше методом. Клубеньки разделяют по окраске на две фракции — с Лб и без него — и анализируют отдельно. Особое внимание необходимо уделить тщательности отмывки клубеньков от иловатых частиц почвы, которые могут сильно исказить результаты анализа.

Навеску клубеньков массой 0,5—2 г быстро растирают в ступке с 0,5 мл воды при добавлении кварцевого песка. Суспензию количественно переносят в пробирки центрифуги. Центрифугирование проводят в охлаждаемой центрифуге типа ЛХ-413 (ЛЗ-402) при 4000 об/мин в течение 10 мин.

**Выделение и расчет содержания Лб.** После центрифугирования раствор переносят в воронку хроматографической колонки. Прибор подсоединяют к водяному насосу и раствор профильтровывают, колонку 3—4 раза промывают водой для удаления растворимых белков, искажающих показатели ФЭК.

Лб прочно адсорбируется в верхней части колонки в виде серо-коричневатого кольца. Приемную камеру прибора освобождают от раствора и промывают.

Элюирование осуществляется полунасыщенным раствором сульфата аммония без вакуумирования. При этом необходимо, чтобы адсорбент все время оставался покрытым жидкостью, так как при попада-

нии в колонку воздуха будет затруднено элюирование Лб и возможны нежелательные изменения свойств пигмента.

Сходящую вниз зону Лб в виде красного кольца количественно собирают в приемник и переносят в мерную колбу на 25 мл. Раствор пигмента доводят до метки полунасыщенным раствором сульфата аммония и его экстинкцию определяют на ФЭК с зеленым светофильтром № 6 (длина волны 530—540 нм). Ширина кюветы 10 мм.

Содержание Лб (мг на 1 г клубеньков) рассчитывают по формуле  $C = E_{540} \cdot V/P \cdot 0,938$ , где  $V$  — объем элюата, мл;  $P$  — навеска клубеньков, г;  $E_{540}$  — по ФЭК; 0,938 — экстинкция раствора Лб при концентрации 1 мг/мл и длине волны 540 нм.

### Определение общего и активного симбиотических потенциалов

Известно, что масса клубеньков зависит от фазы развития растений и условий их выращивания и может оставаться неизменной не более 7—10 дней. У различных бобовых культур изменение ее происходит по-разному. Например, у вики и гороха с наступлением летней засухи клубеньки отмирают и образуются вновь при установлении оптимальной влажности, а у люпина желтого и эспарцета их масса в засушливый период лишь несколько снижается. У многолетних трав, например у люцерны, лядвенца, клевера лугового, при оптимальных условиях симбиоза масса клубеньков достигает максимума к бутонизации — началу цветения, когда производится укос. После укоса в связи с резким снижением поступления углеводов к клубенькам их масса снижается и затем увеличивается к следующему укосу. Кривая масса клубеньков имеет синусоидальный вид.

В опытах [15, 16, 20, 21] установлено, что фиксация атмосферного азота идет только в тех клубеньках, которые содержат Лб. Следовательно, наиболее важно учитывать массу клубеньков с Лб, а общую массу — лишь для характеристики степени активности симбиотического аппарата.

Количество симбиотически фиксированного азота зависит не только от массы клубеньков с Лб, но и от продолжительности ее функционирования. Введенный нами показатель — активный симбиотический потенциал (АСП) объединяет эти два критерия азотфиксации. АСП выражается в кг·сут/га и рассчитывается по формуле  $a = \frac{M_1 + M_2}{2} t$ ,

где  $t$  — период между соседними сроками анализа, сут;  $\frac{M_1 + M_2}{2}$  — средняя масса клубеньков с Лб за период  $t$ , кг/га. АСП за вегетацию определяется по сумме показателей АСП за отдельные периоды.

Так же рассчитывается ОСП, где учитывается масса всех клубеньков. Этот показатель имеет скорее теоретическое значение и определяется в тех случаях, когда необходимо показать влияние отдельных факторов среды на активность симбиоза, поскольку они больше сказываются на массе клубеньков с Лб, чем на общей массе клубеньков. Например, в 1979 г. у вики посевной снижение влажности почвы в период от стеблевания до бутонизации привело к уменьшению массы всех клубеньков на 20 %, а активных — в 69 раз. Существенно различается и продолжительность активного и общего симбиоза.

Таким образом, о влиянии отдельных факторов среды на бобоворизобиальный симбиоз различных культур можно судить по размерам активного симбиотического потенциала.

### Определение количества фиксированного азота за отдельный период вегетации

Анализируя существующие методы расчета количества фиксированного азота воздуха, Е. П. Трепачев [7, 8] пришел к выводу, что ни один из них не позволяет в полевых условиях определить количество



усвоенного азота воздуха за отдельный период онтогенеза. Главным критерием симбиотической азотфиксации он предлагает считать урожай, сформированный за счет симбиотически фиксированного азота. Однако с практической точки зрения более важно иметь обоснованное представление о фактической обеспеченности бобовых культур биологическим азотом в отдельные периоды онтогенеза. Это позволит активно вмешиваться в азотное питание бобовых, управлять формированием их урожая.

В полевых опытах количество фиксированного азота воздуха можно определить при помощи ацетиленового метода.

От начала образования клубеньков до их разрушения периодически, через 8—10 дней, определяется удельная активность симбиоза (УАС) на единицу площади (г N на 1 м<sup>2</sup> в сутки) или на единицу массы клубеньков (г N на 1 кг сырых активных клубеньков в сутки). Для этого в течение суток через равные промежутки времени проводится 5—6 определений активности нитрогеназы. Количество фиксированного азота (г/м<sup>2</sup>) за сутки рассчитывается по формуле  $Y = \sum \bar{n}t/S$ , где  $t$  — период между двумя анализами, ч;  $\bar{n} = (n_1 + n_2)/2$  — средняя нитрогеназная активность за период  $t$ , мг/ч на сосуд ( $n_1$  и  $n_2$  — нитрогеназная активность по двум смежным определениям);  $\sum \bar{n}t$  — суточная нитрогеназная активность, мг N в сутки на сосуд;  $S$  — площадь сосуда, м<sup>2</sup>.

Количество азота, фиксированного из воздуха за любой отрезок вегетации, можно рассчитать по формуле  $N = 10\bar{y}t$ , где  $t$  — период определения, сут;  $N$  — количество азота, фиксированного за период  $t$ , кг/га;  $\bar{y} = \frac{y_1 + y_2}{2}$  — средняя удельная активность симбиоза за период  $t$ , г/м<sup>2</sup> в сутки; 10 — коэффициент пересчета с г/м<sup>2</sup> в кг/га.

Суммируя количество азота, фиксированного за отдельные периоды, можно рассчитать азотфиксацию за вегетационный период.

Этот метод приемлем при наличии соответствующего оборудования.

В исследованиях азотфиксации люцерной, клевером, викой посевной мы применили другой метод, основанный на определении АСП и удельной активности симбиоза, которую устанавливали по разности АСП в двух вариантах и разности усвоенного растениями азота в тех же вариантах. При этом предполагали, что растения с разными симбиотическими аппаратами примерно одинаково используют азот почвы. На этом же предположении основаны методы сравнения с неинкулированной и небобовой культурами.

В наших опытах с викой посевной в 1978 г. в период от начала ветвления до бутонизации (с 16 по 30 июня) разница в АСП между контролем и вариантом СаРКВ составила 755 единиц (1617 минус 862). За это же время в опытном варианте было потреблено азота больше, чем в контроле, на 8,8 кг/га. Считаю, что повышение усвоения азота произошло за счет увеличения симбиотического аппарата. Следовательно, средняя удельная активность симбиоза за этот период составила  $8800 : 755 = 11,7$  г/кг в сутки. Зная значение АСП за данный период, можно рассчитать количество фиксированного из воздуха азота в любом варианте опыта. В частности, в контроле было усвоено азота 10,1 кг/га, а в варианте СаРКВ — 19 кг/га. Аналогичным образом мы определили, что в 1978 г. вика за вегетационный период усвоила азота из воздуха в контроле 34 кг/га, в варианте СаРКВ — 75 кг/га, в 1979 г. — соответственно 4 и 12 кг/га.

Этот метод расчета позволяет определить количество фиксированного азота и при внесении азотных удобрений. Приведем пример. В 1980 г. в контрольном варианте (без азота) вика усвоила 82 кг азота на 1 га, из них 56 кг — из воздуха (расчет по АСП и УАС) и 26 кг — из почвы, в варианте СаРКВ — соответственно 153, 127 и 26 кг. При добавлении к указанным удобрениям азота в норме 244 кг/га (вариант СаРКВ N<sub>1</sub>) фиксация азота воздуха снизилась до 27 кг, из почвы было усвоено 26, из удобрений — 153 кг N. Следовательно, коэффициент использования азота удобрений составил 62 %.

Этот метод расчета имеет ряд преимуществ над существующими. В частности, он позволяет установить количество фиксированного азота за любой период онтогенеза; с его помощью можно определить долю участия каждого источника азота в формировании урожая бобовых культур. Вместе с тем необходима дальнейшая доработка данного метода. Прежде всего нет точного доказательства, что растения с различным симбиотическим аппаратом используют из почвы одинаковое количество азота. Вторым слабым местом является предположение о том, что 1 г клубеньков с леггемоглином одной культуры в одинаковых условиях выращивания в одну и ту же фазу имеет одинаковую или близкую удельную активность симбиоза. Это предположение основано на определении нитрогеназной активности только клубеньков сои.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Доросинский Л. М. Клубеньковые бактерии и нитрагин. Л.: Колос, 1970. —
2. Посыпанов Г. С. О применении стартовых доз азотных удобрений под бобовые культуры. — *Агрехимия*, 1974, № 1, с. 17—22. — 3. Посыпанов Г. С., Чернова В. И. Формирование симбиотического аппарата люцерны в условиях Коми АССР. — *Изв. ТСХА*, 1980, вып. 1, с. 32—36. — 4. Посыпанов Г. С., Чернова В. И., Чернов Б. А. Содержание леггемоглобина и активность дегидрогеназ в клубеньках люцерны в зависимости от условий выращивания. — *Изв. ТСХА*, 1980, вып. 5, с. 30—35. — 5. Посыпанов Г. С. Особенности расчета доз удобрений под бобовые культуры на планируемый урожай. — *Агрехимия*, 1982, № 9, с. 77—82. — 6. Посыпанова В. Н., Посыпанов Г. С., Кобозева Т. П. Размещение клубеньков по корневой системе зернобобовых культур. — В сб.: *Повышение продуктивности кормовой пашни и луговых угодий*. — М.: ТСХА, 1981, с. 9—15. — 7. Трепачев Е. П. О некоторых аспектах симбиотической фиксации азота бобовыми культурами. — *Агрехимия*, 1976, № 1, с. 138—147. — 8. Трепачев Е. П. О методах исследования азотфиксирующей способности бобовых культур. — *Агрехимия*, 1981, № 12, с. 129—141. — 9. Умаров М. М. Ацетиленовый метод изучения азотфиксации в почвенно-микробиологических исследованиях. — *Почвоведение*, 1976, № 11, с. 119—123. — 10. Федоров Е. А. О роли гемоглобина в клубеньках корней бобовых растений. — Автореф. канд. дис. М., 1955. — 11. Ягодина М. С., Ягодин Б. А., Веревкин Е. Л. Некоторые методические подходы при определении биологической фиксации атмосферного азота ацетиленовым методом. — *Физиол. и биохим. культурных растений*, т. 10, № 5, 1978, с. 521—527. — 12. Hardy R. W., Burns R. C., Hebert R. R., Holsten R. D., Jackson E. K. — *Plant a. Soil.*, 1971, spec. vol., p. 561—590. — 13. Hardy R. W., Burns R. C., Holsten R. D. *Soil Biol. a. Biochem.*, 1973, 5, N 1, p. 47—83. — 14. Hardy R. W., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R. C. — *Plant phisiol.*, 1968, vol. 43, p. 1185—1207. — 15. Smith J. D. — *Biochem. J.*, 1949, vol. 44, N 5, p. 585. — 16. Smith J. D. — *Biochem. J.*, 1949, vol. 44, N 5, p. 591. — 17. Stewart W., Fitzgerald G., Burns R. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1967, vol. 58. — 18. Stutz R. S., Bliss H. C. — *Plant a. Soil*, 1973, vol. 38, N 1, p. 209—213. — 19. Virtanen A. I. — *Nature*, 1945, vol. 155, p. 747. — 20. Virtanen A. I., Laine I. — *Nature*, 1946, vol. 157, N 3975, p. 25. — 21. Virtanen A. I., Sorma I., Linkova H. — *Acta chem. scand.*, 1947, N 1, p. 90.

*Статья поступила 14 апреля 1983 г.*

## SUMMARY

The article describes the methods of determining the size of symbiotic apparatus of legume crops, establishes the sizes of monoliths, gives a classification of legume crops according to morphology of symbiotic apparatus, describes the methods of consideration of symbiotics apparatus in wide-row and solid coppings, gives ground for the volume of representative sampling. The article also gives more precise definition methods of nitrogenase activity under field condition and of leghaemoglobin in nodules. Methods of determining general and active symbiotic potentials are described with the formulae of calculating them. The article also suggests the methods of determining the amount of fixed nitrogen during a certain growing period, and specific activity of symbiosis.