

УДК 633.32:631.81

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФИКСАЦИЯ АЗОТА ВОЗДУХА КЛЕВЕРОМ ЛУГОВЫМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТАВА ФИТОЦЕНОЗА И УРОВНЯ МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ

Г. С. ПОСЫПАНОВ, Т. В. БАТКОВА, В. И. ЧЕРНОВА

(Калужский филиал)

Показано, что увеличение нормы минерального азота приводит к уменьшению количества и массы клубеньков, концентрации леггемоглобина, нитрогеназной активности и доли биологически фиксированного азота в общем азоте растений. При этом сбор сухого вещества повышался в злаковобобовых травосмесях по мере увеличения норм азота, а у клевера лугового оставался практически на уровне контроля и лишь при дозе 10 мг азота на 100 г песка повышался на 17 %.

При создании оптимальных условий для эффективного симбиоза биологическая фиксация азота клевером луговым достигает 300 кг/га в год [3]. Посевы клевера 2-го года жизни оставляют в почве с корневыми и пожнивными остатками до 70—80 кг азота на 1 га. В дальнейшем требуется уточнение вопросов: как влияет уровень обеспеченности минеральным азотом на активность симбиоза и каково количество фиксированного азота воздуха при разном составе фитоценоза? Эти вопросы мы изучали в двухфакторном вегетационном опыте.

### Методика

Эксперимент проводился в 1988—1989 гг. в Калужском филиале Тимирязевской академии с клевером луговым сорта Среднерусский и тимофеевкой луговой сорта Московская 362 в песчаной культуре на питательной смеси Прянишникова с использованием  $^{15}\text{N}$ .

Фактор А — состав фитоценоза. Растения выращивали в сосудах на 6 кг сухого песка в чистых и смешан-

ных посевах с участием клевера (50 и 20 %) и тимофеевки (соответственно 50 и 80 %).

Фактор Б — уровень минерального азота в песке. В этом случае изучались следующие варианты: 1 — контроль, или фон — 144 мг N на сосуд (0,1 смеси Прянишникова); 2 — фон + 1,5 мг N на 100 г песка (в дальнейшем условно 1,5 N); 3 — фон + 5 мг N (5 N); 4 — фон + 10 мг N (10 N) в форме  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ;  $^{15}\text{N}$  применялся в форме  $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  по 10, 30 и 40 мг на сосуд. Дополнительно вносили микроэлементы — В, Мо, Zn, Cu, Mn. Семена перед посевом инокулировали ризобиями (штамм 348<sup>а</sup>). Предпосевная влажность песка — 65 % ППВ. Клевер и тимофеевку убирали в период бутонизация — начало цветения.

Определяли высоту растений, содержание хлорофилла по М. С. Миллеру, активность нитрогеназы — ацетиленовым методом, накопление сухой массы разными их органами, количество и массу клубеньков, концентрацию леггемоглобина — по методу С. С. Мелик-Саркисян, активность дегидрогеназы — тетразо-

лиевым методом, накопление азота органами растений — по Кьельдалю, потребление растениями меченого азота — на масс-спектрометре МИ-1309.

### Результаты

Под эффективностью бобово-ризобиального симбиоза понимается интенсивность азотфиксации. От ее размера и количества фиксированного азота воздуха зависит продуктивность бобовых растений.

Так как фиксация азота воздуха происходит в клубеньках, то наиболее точную оценку этого процесса можно дать по развитию симбиоти-

ческого аппарата. Под влиянием дополнительных доз минерального азота численность клубеньков на сосуд уменьшалась в 1,5—2 раза, масса — в 1,1—1,6 раза (табл. 1), а по мере увеличения доли тимофеевки в смешанном посеве значения этих показателей снижались в 3—5 раз.

Масса клубеньков на 1 растение в большей степени характеризует эффективность симбиоза. В этом случае по мере повышения доз азотных удобрений прослеживалась тенденция к снижению массы клубеньков, а с увеличением числа растений тимофеевки в травосмеси — тенденция к ее увеличению.

Известно [1], что содержание в клубеньках леггемоглобина (Лб) оказывает существенное влияние на азотфиксацию у клевера. В наших опытах при внесении минерального азота количество Лб на сосуд уменьшалось в 1,2—1,6 раза, а при уменьшении доли клевера в травосмеси — в 3—4 раза (табл. 2).

Содержание Лб в клубеньках чутко реагирует на все изменения условий выращивания культуры. По на-

Таблица 1  
Численность (шт.) и масса (г) клубеньков у клевера на 1 растение (в числителе) и на сосуд (в знаменателе)

| Состав фитоценоза | Фон | Фон+1,5N | Фон+5N | Фон+10N |
|-------------------|-----|----------|--------|---------|
|-------------------|-----|----------|--------|---------|

#### Численность клубеньков

|                                 |             |             |             |             |
|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Клевер, 100 %                   | 267<br>3743 | 237<br>3323 | 193<br>2702 | 177<br>2473 |
| Клевер, 50 % + тимофеевка, 50 % | 1943        | 1892        | 936         | 1654        |
| Клевер, 20 % + тимофеевка, 80 % | 271<br>813  | 337<br>1011 | 184<br>553  | 227<br>680  |

#### Масса клубеньков

|                                 |              |              |              |              |
|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Клевер, 100 %                   | 0,25<br>3,45 | 0,25<br>3,56 | 0,22<br>3,13 | 0,22<br>3,09 |
| Клевер, 50 % + тимофеевка, 50 % | 1,73         | 1,85         | 1,91         | 1,50         |
| Клевер, 20 % + тимофеевка, 80 % | 0,27<br>0,96 | 0,44<br>1,33 | 0,27<br>0,81 | 0,20<br>0,61 |

Таблица 2  
Масса леггемоглобина (мг, в числителе — на два сырых клубенька; в знаменателе — на сосуд)

| Состав фитоценоза             | Фон          | Фон+1,5N     | Фон+5N       | Фон+10N      |
|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Клевер, 100 %                 | 2,52         | 2,32         | 2,08         | 2,38         |
| Клевер 50 % + тимофеевка 50 % | 8,69         | 8,26         | 6,51         | 7,35         |
| Клевер 20 % + тимофеевка 80 % | 2,85<br>4,93 | 2,81<br>5,20 | 2,55<br>4,87 | 2,51<br>3,77 |
| Клевер 20 % + тимофеевка 80 % | 2,75<br>2,64 | 3,18<br>4,23 | 2,70<br>2,19 | 2,70<br>1,65 |

шим наблюдениям, чем выше масса клубеньков с Лб, тем больше азота воздуха усваивает растение. Поэтому можно предположить, что увеличение нормы минерального азота подавляет азотфиксацию.

Осуществляет и катализирует процесс азотфиксации нитрогеназа, активность которой с возрастанием доз азотных удобрений снижалась в данном опыте как в чистых, так и в смешанных посевах (табл. 3).

Исследователи до сих пор не пришли к единому мнению о причинах этого явления. Одни ученые связывают его со снижением скорости дыхания бактериоидов [6], другие — с задержкой появления клубеньков на корнях растений [4], третьи полагают, что при непосредственном соприкосновении удобрений с клубеньками в них происходят морфологические изменения, которые и сопровождаются снижением

азотфиксирующей активности [5]. Н. П. Львов и В. П. Кретович [2] утверждают, что снижение нитрогеназной активности под действием минерального азота имеет важное физиологическое значение для растений, так как создает возможность быстро и экономно прекратить синтез ненужного в данный момент фермента, переключить клетку с питания симбиотрофным азотом на питание связанным азотом и наоборот.

В качестве косвенного показателя интенсивности азотфиксации может быть использована дегидрогеназная активность. В нашем опыте в контроле при снижении доли клевера в травосмеси активность дегидрогеназы была в 2 раза выше, чем в чистом посеве клевера (табл. 3). Существенное ее повышение отмечено в варианте 10N: в чистом посеве клевера — почти в 3 раза, в смешанном посеве 50 % клевера и 50 % тимофеевки — в 1,6 раза, а при 20 % клевера и 80 % тимофеевки наблюдалось небольшое снижение активности дегидрогеназы.

Содержание хлорофилла в листьях клевера и тимофеевки возрастало с увеличением доз минерального азота (табл. 4).

Наиболее резко повышалась концентрация хлорофилла у тимофеевки. В то же время при уменьшении доли клевера в смеси увеличилось количество хлорофилла и у клевера, и у тимофеевки. Видимо, это связано с улучшением освещения растений и, следовательно, с повышением интенсивности фотосинтеза.

В работах А. А. Нечипоровича отмечено наличие связи между размерами площади листьев и урожаем. В нашем опыте в посевах тимофеевки площадь листьев в опытных вариантах была в 3—4 раза больше, чем в контроле (табл. 5), соответственно повышалось и накопление сухой массы (табл. 6).

Таблица 3  
Активность нитрогеназы и дегидрогеназы

| Состав фитоценоза   | Фон  | Фон+1,5N | Фон+5N | Фон+10N |
|---|------|----------|--------|---------|
| <i>Активность нитрогеназы, мг N на сосуд</i>                |      |          |        |         |
| Клевер, 100 %   | 5,33 | 5,69     | 2,82   | 2,97    |
| Клевер 50 % + тимофеевка 50 %                               | 4,46 | 4,05     | 1,69   | 1,23    |
| Клевер 20 % + тимофеевка 80 %                               | 1,59 | 1,95     | 1,03   | 0,82    |
| <i>Активность дегидрогеназы, мг на 1 г сырого клубенька</i> |      |          |        |         |
| Клевер, 100 %   | 0,95 | 1,05     | 1,02   | 2,62    |
| Клевер 50 % + тимофеевка 50 %                               | 1,50 | 1,52     | 1,44   | 2,38    |
| Клевер 20 % + тимофеевка 80 %                               | 1,77 | 0,91     | 1,33   | 0,94    |

Таблица 4

Содержание хлорофилла (мг на 1 г сырой массы) в листьях клевера лугового (в числителе) и тимофеевки (в знаменателе)

| Состав фитоценоза               | Фон  | Фон+1,5N | Фон+5N | Фон+10N |
|---------------------------------|------|----------|--------|---------|
| Клевер, 100 %                   | 0,77 | 1,15     | 1,25   | 1,85    |
| Клевер, 50 % + тимофеевка, 50 % | 1,04 | 1,19     | 1,26   | 1,97    |
| Клевер, 20 % + тимофеевка, 80 % | 1,17 | 1,29     | 1,21   | 1,92    |
| Тимофеевка, 100 %               | 1,33 | 1,35     | 1,95   | 2,31    |

Таблица 5

Площадь листьев (см<sup>2</sup>/сосуд) клевера лугового (в числителе) и тимофеевки (в знаменателе)

| Состав фитоценоза               | Фон  | Фон+1,5N | Фон+5N | Фон+10N |
|---------------------------------|------|----------|--------|---------|
| Клевер, 100 %                   | 2370 | 2405     | 1947   | 2415    |
| Клевер, 50 % + тимофеевка, 50 % | 1451 | 1647     | 1211   | 1241    |
| Клевер, 20 % + тимофеевка, 80 % | 681  | 743      | 621    | 679     |
| Тимофеевка, 100 %               | 641  | 775      | 1673   | 2358    |

Такая же закономерность наблюдалась и у травосмесей, что определяется в основном увеличением доли сухой массы тимофеевки. В чистых посевах клевера повышения значений этих показателей при внесении минерального азота не отмечалось, т. е. в этом случае накопление сухой массы клевера происходило за счет симбиотической фиксации азота, а у тимофеевки — за счет азота удобрений.

Таблица 6

Накопление сухой массы (г/сосуд) в органах растения

| Орган растения                         | Фон  | Фон+1,5N | Фон+5N | Фон+10N |
|--|------|----------|--------|---------|
| <i>Клевер, 100 %</i>                   |      |          |        |         |
| Листья                                 | 13,1 | 14,2     | 11,6   | 13,8    |
| Стебли                                 | 9,9  | 9,3      | 8,7    | 16,4    |
| Корни                                  | 9,2  | 9,4      | 9,3    | 8,5     |
| <i>Клевер, 50 % + тимофеевка, 50 %</i> |      |          |        |         |
| Листья                                 | 5,9  | 6,3      | 5,4    | 6,2     |
|  | 1,5  | 1,8      | 3,1    | 6,8     |
| Стебли                                 | 6,9  | 8,3      | 6,9    | 9,0     |
|  | 0,9  | 1,3      | 3,2    | 8,8     |
| Корни                                  | 5,2  | 5,2      | 4,8    | 5,3     |
|  | 1,8  | 2,2      | 5,5    | 7,4     |
| <i>Клевер, 20 % + тимофеевка, 80 %</i> |      |          |        |         |
| Листья                                 | 3,8  | 3,0      | 3,5    | 3,9     |
|  | 1,9  | 2,4      | 4,6    | 8,6     |
| Стебли                                 | 2,8  | 2,9      | 3,6    | 3,9     |
|  | 0,9  | 1,3      | 5,6    | 9,3     |
| Корни                                  | 2,4  | 2,9      | 3,4    | 3,8     |
|  | 3,1  | 4,6      | 7,9    | 8,4     |
| <i>Тимофеевка, 100 %</i>               |      |          |        |         |
| Листья                                 | 2,9  | 3,2      | 6,5    | 8,0     |
| Стебли                                 | 1,8  | 1,8      | 6,8    | 16,9    |
| Корни                                  | 3,5  | 5,2      | 16,9   | 15,3    |

В результате применения <sup>15</sup>N было установлено, что основная часть фиксированного в корнях клевера атмосферного азота поступала в надземную массу. При низких дозах минерального азота наибольшее количество <sup>15</sup>N обнаружено в стеблях клевера: примерно в 2—4 раза больше, чем в корнях и листьях (табл. 7).

У тимофеевки самым высоким содержанием <sup>15</sup>N характеризовались корни, в стеблях и листьях оно было несколько ниже. С увеличением дозы минерального азота возрастало накопление <sup>15</sup>N в органах растений:

Таблица 7

Локализация  $^{15}\text{N}$  (изб. ат. %) в растениях клевера (в числителе) и тимофеевки (в знаменателе)

| Орган растения                         | Дозы $^{15}\text{N}$ , м/сосуд |       |       |
|--|--------------------------------|-------|-------|
|  | 10                             | 30    | 40    |
| <i>Клевер, 100 %</i>                   |                                |       |       |
| Листья                                 | 0,032                          | 0,133 | 0,485 |
| Стебли                                 | 0,126                          | 0,409 | 0,536 |
| Корни                                  | 0,058                          | 0,265 | 0,466 |
| <i>Клевер, 50 % + тимофеевка, 50 %</i> |                                |       |       |
| Листья                                 | 0,041                          | 0,127 | 0,471 |
|  | 0,427                          | 0,413 | 0,740 |
| Стебли                                 | 0,170                          | 0,388 | 0,515 |
|  | 0,345                          | 0,750 | 0,759 |
| Корни                                  | 0,060                          | 0,245 | 0,471 |
|  | 0,532                          | 1,009 | 1,151 |
| <i>Клевер, 20 % + тимофеевка, 80 %</i> |                                |       |       |
| Листья                                 | 0,035                          | 0,115 | 0,476 |
|  | 0,472                          | 0,363 | 0,713 |
| Стебли                                 | 0,181                          | 0,227 | 0,532 |
|  | 0,335                          | 0,594 | 0,738 |
| Корни                                  | 0,086                          | 0,225 | 0,470 |
|  | 0,689                          | 0,960 | 1,309 |
| <i>Тимофеевка, 100 %</i>               |                                |       |       |
| Листья                                 | 0,331                          | 0,396 | 0,740 |
| Стебли                                 | 0,222                          | 0,331 | 0,536 |
| Корни                                  | 0,487                          | 1,004 | 1,267 |

у клевера — в 5—7 раз, а у тимофеевки — примерно в 2 раза.

Однако при самой низкой в нашем опыте дозе  $^{15}\text{N}$  (10 мг на сосуд) накопление его у тимофеевки было в 5 раз больше, при дозе 30 мг — в 3 раза, а при наивысшей (40 мг) — в 2 раза больше, чем у клевера.

На долю симбиотического усвоенного азота у клевера приходилось от 45—73 % азота при наибольшей дозе минерального азота до 80—95 % в контроле (табл. 9).

Общее потребление азота растениями (в расчете на сосуд) состави-

ло в частном посеве клевера 1066 мг; в смешанных посевах 50×50 и 20×80 — 556 и 311, в посеве тимофеевки — 85 мг. При этом доля биологически усвоенного азота равнялась соответственно 95, 91, 80 и 0 %. Таким образом, с уменьшением доли клевера в смеси уменьшается доля фиксированного азота на сосуд, снижается накопление общего азота растениями. Потребление минерального азота увеличивается по мере увеличения доз азотных удобрений.

Последствие рассмотренных вариантов изучалось на ячмене. Улучшение режима азотного питания за счет биологического азота положительно сказалось на его урожае (табл. 8), который после клевера лугового в чистых посевах, а также в травосмеси (при 50 % участии его в смеси) был в 1,9—2,0 раза выше, чем после тимофеевки.

#### Выводы

1. В вегетационном опыте с клевером увеличение дозы минерального азота приводило к уменьшению

Таблица 8

Последствие посевов трав (урожай зерна ячменя при 14 % влажности, г/сосуд)

| Состав фитоценоза               | Фон  | Фон + 1,5N | Фон + 5N | Фон + 10N |
|---------------------------------|------|------------|----------|-----------|
| Клевер, 100 %                   | 5,09 | 5,01       | 4,44     | 5,79      |
| Клевер, 50 % + тимофеевка, 50 % | 5,35 | 5,09       | 4,60     | 6,09      |
| Клевер, 20 % + тимофеевка, 80 % | 3,93 | 4,09       | 4,23     | 5,03      |
| Тимофеевка, 100 %               | 2,60 | 2,99       | 3,18     | 4,22      |
| НСР <sub>05</sub> — 0,118       |      |            |          |           |

Источники азота в питании клевера и тимopheевки

| Вариант удобрения                       | Доза азота, мг/сосуд |                         | Сухое вещество, г/сосуд | Максимальное потребление азота |          |             |          |                              |
|---|----------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------|----------|-------------|----------|------------------------------|
|   |                      |                         |                         | симбиотически фиксированного   |          | удобрений   |          |                              |
|   | все-го               | в т. ч. <sup>15</sup> N |                         | общего, мг/сосуд               | мг/сосуд | % от общего | мг/сосуд | коэффициент использования, % |
| <i>Клевер, 100 %</i>                    |                      |                         |                         |                                |          |             |          |                              |
| Фон                                     | 144                  | —                       | 32,1                    | 1066                           | 1015     | 95          | 51       | 35                           |
| Фон + 1,5                               | 234                  | 10                      | 32,9                    | 1089                           | 1005     | 92          | 84       | 36                           |
| » + 5                                   | 444                  | 30                      | 29,6                    | 934                            | 743      | 80          | 191      | 43                           |
| » + 10                                  | 744                  | 40                      | 38,7                    | 1214                           | 887      | 73          | 327      | 44                           |
| <i>Клевер, 50 % + тимopheевка, 50 %</i> |                      |                         |                         |                                |          |             |          |                              |
| Фон                                     | 144                  | —                       | 22,1                    | 556                            | 506      | 91          | 50       | 35                           |
| Фон + 1,5                               | 234                  | 10                      | 25,0                    | 613                            | 529      | 86          | 84       | 36                           |
| » + 5                                   | 444                  | 30                      | 28,8                    | 594                            | 403      | 68          | 191      | 43                           |
| » + 10                                  | 744                  | 40                      | 43,5                    | 739                            | 412      | 56          | 327      | 44                           |
| <i>Клевер, 20 % + тимopheевка, 80 %</i> |                      |                         |                         |                                |          |             |          |                              |
| Фон                                     | 180                  | —                       | 14,3                    | 311                            | 248      | 80          | 63       | 35                           |
| Фон + 1,5                               | 270                  | 10                      | 17,0                    | 322                            | 227      | 70          | 95       | 35                           |
| » + 5                                   | 480                  | 30                      | 28,6                    | 476                            | 270      | 57          | 206      | 43                           |
| » + 10                                  | 780                  | 40                      | 37,9                    | 622                            | 279      | 45          | 343      | 44                           |
| <i>Тимopheевка, 100 %</i>               |                      |                         |                         |                                |          |             |          |                              |
| Фон                                     | 240                  | —                       | 8,2                     | 85                             | —        | —           | 85       | 35                           |
| Фон + 1,5                               | 330                  | 10                      | 10,2                    | 103                            | —        | —           | 103      | 31                           |
| » + 5                                   | 540                  | 30                      | 23,8                    | 231                            | —        | —           | 231      | 43                           |
| » + 10                                  | 840                  | 40                      | 40,1                    | 370                            | —        | —           | 370      | 44                           |

количества и массы клубеньков.

2. Концентрация леггемоглобина в клубеньках клевера уменьшалась по мере увеличения дозы азота и увеличивалась с уменьшением доли клевера в травосмеси.

3. Активность нитрогеназы у клевера лугового снижалась при увеличении доз азотных удобрений, а активность дегидрогеназы и содержа-

ние хлорофилла повышались.

4. Накопление сухой массы у растений возрастало с увеличением площади листьев.

5. При низких дозах азотных удобрений максимальное количество азота у клевера накапливалось в стеблях; в 2—4 раза меньше азота было в корнях и листьях. У тимopheевки в основном обогащались азо-

том корни, несколько ниже его содержание было в листьях и стеблях. С увеличением дозы азотных удобрений возрастало накопление минерального азота во всех органах растений.

6. Доля биологического азота в урожае клевера, составившая в чистом посеве в контроле 95 %, в смешанных посевах при 50 и 20 % клевера снизилась соответственно до 91 и 80 %, а при внесении азотных удобрений — до 45 %.

7. Уменьшение доли клевера в травосмеси снижало его последствие на урожай ячменя в 1,5—2 раза. При увеличении доз азота урожай ячменя после чистого посева клевера и травосмеси с 50 % его участием возрастал незначительно, после травосмеси, в которой преобладала тимофеевка, — в 1,3 раза, после чистой тимофеевки — в 1,6 раза.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кретович В. Л. Молекулярные механизмы биологической фиксации азота.— Вест. АН СССР, 1979, № 7, с. 23—32.— 2. Львов Н. П., Кретович В. Л. Регуляция биосинтеза нитрогеназы у микроорганизмов.— Изв. АН СССР. Сер. биол., 1975, № 1, с. 33—43.— 3. Посьпанов Г. С. Влияние интенсивного возделывания бобовых трав на их симбиотическую активность, сбор белка и повышение плодородия почвы.— Вест. с.-х. науки, 1987, № 9, с. 61—64.— 4. Harper J. Gibson A.— Grop Sci., 1984, vol. 24, N 4, p. 797—801.— 5. Houward F.— Plant a. Soil., 1980, vol. 54, N 1, p. 51—63.— 6. Trinchant J. C., Rigand J.— J. Plant Physiol., 1984, vol. 116, N 3, p. 209—217.

*Статья поступила 10 января 1990 г.*