

УДК 631.461.52:633.31'358:631.811.98

ИЗМЕНЕНИЕ СИМБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И УРОЖАЙНОСТИ ГОРОХА И ЛЮПИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПАРА-АМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ

О. Г. ВОЛОБУЕВА, В. К. ШИЛЬНИКОВА

(Кафедра микробиологии)

В вегетационных и полевых опытах с горохом сортов Вятич, Норд установлена их сортовая отзывчивость на ПАБК. Отмечено значительное влияние ПАБК на активность нитрогеназы в клубеньках растений гороха сорта Норд, особенно в фазу начала цветения. Урожайность этого сорта при обработке семян ПАБК в концентрации 0,005 % повышалась на 11,6 % ц/га. У люпина сорта Тимир 1 эффект ПАБК нестабилен: в 1990 г. ПАБК в концентрации 0,25 % повысил урожай на 8,3 ц/га, в 1989 г. стимулирующий эффект отсутствовал, что, очевидно, связано с метеорологическими условиями вегетационного периода.

Пара-аминобензойная кислота (ПАБК) — физиологически активное природное соединение, участвующее в обменных процессах растительных и животных организмов. Она способствует повышению урожайности сельскохозяйственных культур, стимулирует ферментативную активность растений [2, 3, 11, 12], как составная часть фолевой кислоты ПАБК необходима клеткам бактерий для синтеза пуринов, тимины и ряда аминокислот, в частности глицина, серина и метионина [4]. Действие ПАБК на растения зависит от условий года, сорта, способа обработки, посевных качеств семян [10, 13].

Благоприятное влияние ПАБК на ферментативные процессы различных видов растений, ее роль как предшественника соединений, необходимых бактериям, и, как известно, установленное Н. А. Боме с соавторами [2] положительное воздействие на рост и развитие гороха дают основание предполагать, что этот биостимулятор участвует в симбиозе бобовых растений с клубеньковыми бактериями.

Задача данного исследования — выяснение характера влияния ПАБК на симбиотическую активность и ультраструктуру клубеньков гороха и люпина.

Методика

Вегетационные и полевые опыты проводили в 1989—1990 гг. во ВНИИ зернобобовых культур (Орловская обл.) на темно-серой лесной почве. Агрохимическая характеристика почвы приведена ранее [10]. В вегетационном опыте в соуды Митчерлиха (масса абсолютно сухой почвы 3875 г) вносили в качестве фонового удобрения 2 г суперфосфата, 1,5 г калийной соли; полив — до 60 % ПВ, повторность 7-кратная. В полевом опыте площадь делянки 25—30 м² (в зависимости от года), расположение вариантов рендомизированное, повторность 4-кратная. Посев осуществляли рядовым способом мелкоделяночной селекционной сеялкой СН-16. Норма высева семян гороха 330 кг/га, масса 1000 семян 253,3 г, всхожесть 95 %, чистота 100 %. Норма высева семян люпина 162,2 кг/га, масса 1000 семян 122,3 г, всхожесть 98 %, чистота 100 %.

Для инокуляции семян гороха сортов Вятич (1989 г.) и Норд (1990 г.) использовали клубеньковые бактерии гороха (штамм 250а, ризоторфин, приготовленный на этом штамме), для люпина сорта Тимир 1 — клубеньковые бактерии люпина (штамм 610, ризоторфин, приготовленный на этом штамме). В результате лабораторных определений всхожести и энергии прорастания семян, которые выдерживали в водных растворах ПАБК 1,0; 0,5; 0,25; 0,05; 0,01; 0,005; 0,001; 0,0001 % в течение 2, 5, 10, 15, 20 и 24 ч, было установлено, что лучшие концентрации кислоты — 0,25; 0,01; 0,005 и 0,001 %, экспозиция — 10 ч. Их применяли в вегетационных и полевых опытах. Обработку семян проводили непосредственно перед посевом, затем сушили их на воздухе в течение 2 ч.

В процессе вегетации вели фенологические наблюдения, определяли массу клубеньков, активность в них нитрогеназы ацетиленовым методом на газовом хроматографе «Цвет-106» по методу В. П. Орлова с соавторами [7], учитывали урожай и анализировали его структуру.

Параллельно для электронно-микроскопических исследований выращивали горох сорта Норд в водной культуре на среде Ли без азота [15] в камере при 25 °С и 16-часовом фотопериоде под лампами, обеспечивающими освещенность 3000 лк. Семена обрабатывали по Натману 3—4 мин в концентрированной серной кислоте, многократно отмывали стерильной водой, промывали в чашках Петри. Наклюнувшиеся семена асептически переносили в эксикатор, инокулировали штаммом клубеньковых бактерий гороха 250а (из расчета 20—30 тыс. клеток на семя); контроль — без инокуляции. На 6-е сутки семена высаживали в водную культуру со средой Ли. В водный раствор дополнительно вносили суспензию штамма 250а и 0,005 % раствор ПАБК. В межфазный период бутонизация — начало цветения клубеньки фиксировали по методу Карновского в 7-кратной повторности [14]. Срезы получали на ультрамикротоме KB-8800 (KB, Швеция), контрастировали 1 % водным раствором уранилацетата и 0,2 % цитратом свинца. Препараты просматривали в электронном микроскопе EM-100СХ (ЕО, Япония).

Результаты

В полевом опыте в 1989 г. всходы люпина появились на 11-е сутки, в 1990 г. гороха и люпина — на 15-е, а в вегетационном опыте — на 5-й день после посева. В контрольных вариантах (без обработки ПАБК) этих опытов на фоне заражения клубеньковыми бактериями

Таблица 1

Характеристика растений гороха сорта Вятч в вегетационном опыте 1989 г.

Показатель	Контроль			ПАБК						НСР ₀₅
				0,005 %			0,25 %			
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	
Надземная масса, г/раст	6,5	10	19,3	7,5	11,8	22,3	5,6	11,9	24,6	3,2
Высота растений, см	26	45	45,3	30	46,8	50	31	48	49	4,1
Масса клубеньков, мг/раст	50	21	—	80	90	—	60	300	—	—
Активность нитрогеназы, нмоль/раст·ч	1495	1014	—	1767	2128	—	1676	7250	—	—
Число бобов на сосуд	—	—	12	—	—	13	—	—	13	2,7
Число семян на сосуд	—	—	29	—	—	34	—	—	36	7,1
Масса семян, г/сосуд	—	—	6,5	—	—	6,8	—	—	8,6	1,9

Примечание. Здесь и в табл. 3: I — фаза бутонизации; II — наливы плодов; III — уборка урожая.

Таблица 2

Характеристика растений гороха сортов Вятч (В) и Норд (Н) в полевых опытах 1989, 1990 гг.

Показатель	Контроль		ПАБК					
			0,005 %		0,01 %		0,25 %	
	В	Н	В	Н	В	Н	В	Н
Надземная масса в фазу бутонизации, г/раст	13,4	12,9	15,5	14,4	—	13,6	14,4	—
Масса клубеньков, мг/раст:								
бутонизация	60	48	68	54	—	62	62	—
начало цветения	24	22	30	36	—	73	84	—
Активность нитрогеназы, нмоль/раст·ч:								
бутонизация	2558	1145	3914	1355	—	2087	4240	—
начало цветения	1326	177	2703	857	—	1180	2645	—
При уборке урожая:								
масса 1000 семян, г	208	275	265	280	—	283	198	—
число растений на 1 м ²	87	88	92	118	—	108	115	—
высота растений, см	63	81	68	87	—	83	56	—
масса снопа, г/м ²	870	1305	1000	1528	—	1473	927	—
масса соломы, включая створки, г/м ²	443	663	570	798	—	723	518	—
число бобов на 1 м ²	500	542	500	701	—	562	512	—
число семян на 1 м ²	1600	1836	1500	2359	—	2086	1400	—
масса бобов, г/м ²	417	684	399	873	—	822	348	—
масса семян, г/м ²	324	578	301	698	—	593	260	—
урожай, ц/га	24,9	49,1	25,8	60,7	—	56	25,8	—

НСР₀₅ для урожая у сорта Вятч — 3,2, у сорта Норд — 5,2.

значения всех исследуемых показателей были ниже (табл. 1—4).

Наибольшая отзывчивость на ПАБК выявлена у гороха сорта Норд, причем максимальный эффект отмечен в полевых опытах при обработке семян этого сорта раствором ПАБК в концентрации 0,005 %, в остальных вариантах проявлялась лишь тенденция к повышению урожая. Несмотря на незначительное превышение массы клубеньковой ткани в вариантах с ПАБК, под ее влиянием сильно увеличивалась активность нитрогеназы в клубеньках, особенно в фазу начала цветения (табл. 2), что позволяет предположить действие ПАБК не только на растение-хозяина, но и на микросимбионт. Возможно, она стимулирует функциональную активность клубеньковых бактерий [8] или же опосредованно влияет на их метаболизм через растение [11], а затем ставшие более активными ризобии вносят свой вклад в симбиотрофные взаимоотношения с растением.

Стимулирующий эффект ПАБК у гороха сорта Вятч, отмеченный в вегетационном опыте (табл. 1), практически отсутствовал в полевом (табл. 2).

Хотя масса и нитрогеназная активность клубеньков в вегетацион-

ном опыте в фазу налива плодов (табл. 1) под действием ПАБК увеличивалась существенно, роль микросимбионта в повышении эффективности симбиоза не возросла. В полевых условиях эта закономерность сохранилась.

Влияние ПАБК на симбиотическую систему люпин — ризобии оказалось нестабильным: наблюдались и слабая тенденция повышения продуктивности инокулированных растений в вегетационном опыте (табл. 1), и практически полное отсутствие стимуляции в полевых опытах 1989 г., и высокий достоверный положительный эффект при использовании ПАБК в концентрации 0,25 % в 1990 г. (табл. 4). По-видимому, различия по урожайности в 1989 и 1990 гг. определялись метеорологическими условиями вегетационных периодов. Так, в 1989 г. с 6 по 14 июня (фаза бутонизации) температура воздуха на 5—9 °С была выше нормы (максимальная 30—32 °С), а в июле (фаза цветения) — на 2 °С ниже нормы. В конце июня 1989 г. шли ливневые дожди и месячная сумма осадков на 54 %, а в июле — на 14 % превышала норму. Этот же период вегетации в 1990 г. был умеренно теплым и влажным. Возможно, различия в урожайности в 1989

Таблица 3

Характеристика растений люпина сорта Тимир 1 в вегетационном опыте 1989 г.

Показатель	Контроль			ПАБК						НСР ₀₅
				0,005 %			0,25 %			
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	
Надземная масса, г/раст	6,1	7,5	29	7,5	11,8	30	7,9	11,3	33	3,8
Высота растений, см	40	60	61	49	60	60	53	60	63	3,6
Масса клубеньков, мг/раст	420	350	—	110	450	—	110	200	—	—
Активность нитрогеназы, нмоль/раст · ч	2208	1369	—	5434	6202	—	4917	7017	—	—
Число бобов на сосуд	—	—	10	—	—	10	—	—	13	3,7
Число семян на сосуд	—	—	28	—	—	26	—	—	37	3,6
Масса семян, г/сосуд	—	—	1,93	—	—	1,97	—	—	3,93	1,7

Характеристика растений люпина сорта Тимир 1 в полевых опытах 1989 и 1990 гг.

Показатель	Контроль		ПАБК			
			0,01 %		0,25 %	
	1989	1990	1989	1990	1989	1990
Надземная масса в фазу бутонизации, г/раст	16,1	15,7	19,0	26,6	18,0	22,9
Масса клубеньков, мг/раст:						
бутонизация	124	125	159	192	125	182
налив плодов	190	133	480	363	320	463
Активность нитрогеназы, нмоль/раст · ч:						
бутонизация	2423	900	6626	4415	3457	2249
налив плодов	1280	767	6400	1705	3623	853
При уборке урожая:						
масса 1000 семян, г	112	—	114	—	114	—
число растений на 1 м ²	119	168	106	159	131	200
высота растений, см	84,5	80	80	80	88	76
масса снопа, г/м ²	1370	1578	1088	1959	1910	1857
число бобов на 1 м ²	803	938	694	1110	717	975
число семян на 1 м ²	2505	2595	1961	3334	2524	2878
масса бобов, г/м ²	453	620	375	676	570	632
масса семян, г/м ²	260	485	233	538	330	512
урожай, ц/га	17,0	19,0	17,6	23,8	17,9	27,3
НСР ₀₅ для 1989 г.— 2,5; для 1990 г.— 1,6						

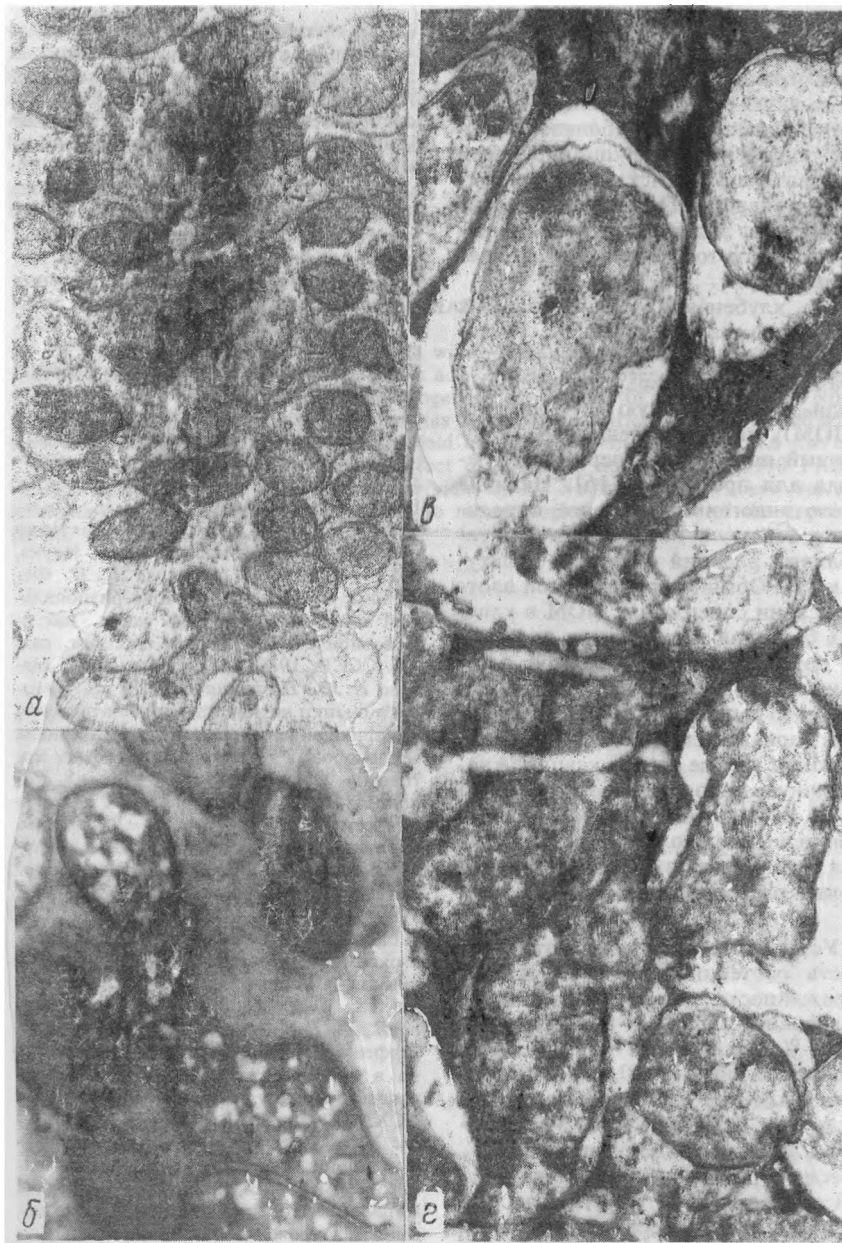
и 1990, гг. определялись и изменением некоторых агротехнических приемов: так, норма высева семян люпина в 1989 г. составляла 131 кг/га (330 г на одну деланку), а в 1990 г.— 162,2 кг/га (405,5 г). Увеличение нормы высева семян определялось имеющимися данными [11] о том, что этот прием позволяет сохранить преимущества применения ПАБК.

Повышение урожайности (на 44 %) при обработке семян люпина ПАБК, очевидно, в большей степени зависит от воздействия регулятора на физиологические процессы у растений, чем на метаболизм ризобий, поскольку масса и нитрогеназная активность клубеньков заметно не изменялись под ее влиянием.

Каких-либо четких закономерностей в изменении нитрогеназной активности клубеньков не выявлено. Так, в 1989 г., когда различий между вариантами по урожайности почти не отмечалось, уровень нитрогеназ-

ной активности клубеньков во всех вариантах оказался несколько выше, чем в 1990 г. Однако все же контрольные варианты всегда (табл. 3, 4) уступали опытным по этому показателю. Как правило, уровень нитрогеназной активности был выше в фазу бутонизации, и именно в этот период, по мнению ряда исследователей [5], клубеньковые бактерии начинают наиболее активно фиксировать молекулярный азот.

Применение метода электронной микроскопии позволило выяснить некоторые детали механизма действия ПАБК на эффективность симбиоза. Изучение зрелой бактериоидной ткани показало, что в межфазный период бутонизации — цветение в клубеньках всех вариантов бактериоидная зона (рисунок) была заполнена сформировавшимися бактериоидами (а, б) и бактериоидами с сильно развитым перифазаидным пространством (в, г). По данным И. Н. Андреевой [1], перифаза-



Бактероидные зоны в клубеньках гороха сорта Норд.

a — клубеньки образовались без инокуляции. $\times 6100$; *б* — клубеньки образовались без инокуляции, обработка семян ПАБК. В бактериоиде видны гранулы ПОМ, $\times 8200$; *в, г* — обработка семян ризобиями — ($\times 12000$) и ПАБК ($\times 8200$), четко видны перибактероидные пространства вокруг бактериоидов.

тероидное пространство (ПБП) как зона между микро- и макросимбионтом, ограниченная мембраной, играет важную роль в регуляции транспорта веществ и метаболизме формирующейся и функционирующей симбиотической системы. В процессе биогенеза ПБП активное участие принимают эндоплазматический ретикулум клеток хозяина и аппарат Гольджи.

В клубеньках, образованных спонтанно на фоне ПАБК, бактериоиды заполнены электронно-прозрачными гранулами, содержащими поли- β -оксимасляную кислоту (ПОМ), запасное вещество, эндогенный накопитель энергии и углевода для прокаротиот [16]. Наличие этого эндогенного резерва определяет большую пластичность метаболизма ризобий в чистых культурах [9]. Обычно при активной азотфиксации содержание ПОМ в клетках бактерий минимально, поскольку синтез и распад ее при этом наиболее интенсивны. Надо полагать, что депонирование ПОМ в данном варианте свидетельствует о невысоком уровне азотфиксации. Аналогичную закономерность выявила Г. И. Новикова [6] при изучении природных фенольных соединений как стимуляторов азотфиксации бобовых растений.

Установлена сортовая отзывчивость растений гороха на ПАБК. Урожайность гороха сорта Норд в варианте ПАБК в концентрации 0,005 % повышалась на 11,6 ц/га, а сорта Вятка — на 0,9 ц/га. Влияние ПАБК на люпин было нестабильным. Если в 1990 г. этот биостимулятор в концентрации 0,25 % обеспечил повышение урожая на 8,3 ц/га, то в 1989 г. стимулирующий эффект отсутствовал, что, вполне вероятно, связано с особенностями метеорологических условий в период вегетации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева И. Н., Козлова Г. И., Ливанова Г. И. и др. Перибактероидное пространство корневых клубеньков бобовых: электронно-микроскопическое исследование.— Физиол. раст., 1989, т. 36, вып. 3, с. 55—552.— 2. Боже Н. А., Липовыцна Т. Т., Воробьева Т. Т. Влияние ПАБК на рост и развитие яровой пшеницы, ячменя, овса, гороха.— В кн.: Хим. мутагены и пара-аминобензойная кислота в повышении урожайности сельскохозяйственных растений.— М.: Наука, 1989, с. 88—92.— 3. Гоник С. А. Изучение действия ПАБК на яровую пшеницу.— В кн.: Хим. мутагены и пара-аминобензойная кислота в повышении урожайности сельскохозяйственных растений.— М.: Наука, 1989, с. 97.— 4. Ленинджер А. Биохимия.— М.: Мир, 1974, с. 628.— 5. Мишустин Е. Н., Шильникова В. К. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс.— М.: Наука, 1973, с. 182.— 6. Новикова Г. И. Фенольные соединения и бобово-ризобийный симбиоз.— Автореф. канд. дис.— Новосибирск, СО Центр. сиб. бот. сад. АН СССР, 1989.— 7. Орлов В. П., Орлова И. Ф., Щербина Е. Н. и др. Методика оценки активности симбиотической азотфиксации селекционного материала зернобобовых культур ацетиленовым методом.— Орел, 1984, с. 10—14.— 8. Рапопорт И. А. Действие ПАБК в связи с генетической структурой.— В кн.: Хим. мутагены и пара-аминобензойная кислота в повышении урожайности сельскохозяйственных растений.— М.: Наука, 1989.— С. 3—37.— 9. Романов В. И. Физиологическая роль и метаболизм поли- β -оксимасляной кислоты у микроорганизмов.— Успехи биол. химии, 1977, № 18, с. 211—230.— 10. Шильникова В. К., Волобуева О. Г., Гурьев Г. П. Эффективность инокуляции семян гороха в зависимости от обработок синтетическими регуляторами роста.— Изв. ТСХА, 1992, вып. 1, с. 85—91.— 11. Эйгес Н. С. Влияние ПАБК на сорта озимой пшеницы в условиях производственного опыта.— В кн.: Хим. мутагены и пара-аминобензойная кислота в повышении урожайности с.-х. растений.— М.: Наука, 1989, с. 62.— 12. Эйгес Н. С. Особенности влияния ПАБК на фенотип яровой пшеницы и других зерновых

культур.— В кн.: Хим. мутагены и пара-аминобензойная кислота в повышении урожайности с.-х. растений. М.: Наука, 1989, с. 66.— 13. *Эйгес Н. С.* Активация фенотипа с помощью ПАБК.— В кн.: Хим. мутагены и пара-аминобензойная кислота в повышении урожайности с.-х. растений. М.: Наука, 1989, с. 144—153.— 14. *Carnovsky M. J.*—

Cell. Biol., 1967, vol. 27, N 2, p. 134.— 15. *Lie T. A.*— Plant and soil, 1969, vol. 30, N 3, p. 391.— 16. *Lemoigne M., Delaporte B., Croson M.*— Contribution a l'etude botanique et biochimique des bacteries du genre Bacillus. Ann. Inst. Pasteur, 1944, vol. 70, N 78, p. 224—233.

Статья поступила 15 апреля 1992 г.

SUMMARY

In greenhouse and field experiments with Vyatich and Nord pea varieties their varietal susceptibility to para-aminobenzoic acid (PABA) has been found. Considerable effect of PABA on the activity of nitrogenase in nodules of pea plants of Nord variety, especially in early blooming phase, has been observed. After treating the seed with PABA in concentration of 0.005 % the yield of the variety increased by 11.6 hw/ha.

In Timir 1 variety of lupine the effect of PABA is not stable: in 1990 PABA in concentration of 0.25 % increased the yield by 8.3 hw/ha, in 1989 there was no stimulating effect, which probably is due to meteorological conditions of the growing period.