

УДК 633.3-.631.461.5-.631.847.21

## ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ НЕКОТОРЫХ МИНЕРАЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ОБРАЗОВАНИИ КЛУБЕНЬКОВ И ФИКСАЦИИ АТМОСФЕРНОГО АЗОТА У БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ

И. СТАНЧЕВА, к. с.-х. н.\*; М. ГЕНЕВА, М. ХРИСТОЗКОВА,  
Г. ЦВЕТКОВА, Г. ЗЕХИРОВ, Г. ГЕОРГИЕВ

(Институт физиологии растений «Акад. М. Попов»,  
Болгарская Академия Наук)

**Исследовано влияние дефицита и повышенного содержания фосфора (P), бора (B) и молибдена (Mo) на образование клубеньков и активность фиксации азота у гороха и сои. Установлена непосредственная связь между содержанием фосфора и бора в питательной среде и количеством специфических флавоноидов в корневых эксудатах, играющих роль индукторов для образования клубеньков у бобовых. Отрицательное влияние отсутствия молибдена в питательной среде на образование клубеньков, активность азотфиксации и содержание аминокислот в растительных тканях можно избежать при введении питательных элементов через листья.**

Симбиотическая азотфиксация включает комплекс взаимодействий бобовых растений с почвенными бактериями 5 различных родов: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* и *Rhizobium*. В результате симбиотических взаимодействий образуется новый орган — клубеньки. Этапы образования клубеньков очень чувствительны к уровню минеральных элементов [1] как в условиях недостатка [17], так и их избытка [13].

После азота фосфор является одним из основных биогенных элементов, регулирующих рост и развитие растений. Фосфор оказывает влияние на симбиотическую фиксацию азота, так как стимулирует рост растения-хозяина, а также образование нормально функционирующих клубеньков [8]. Фосфорный дефицит оказывает влияние на процессы инфицирования, поскольку задерживает выделение специфических флавоноидов в корневых эксудатах, играющих роль индукторов при образовании клубеньков, а также прикрепление бак-

терий к корневым волоскам [12]. Бор в структуре клеточной стенки [7], фенолпропаноидном пути [15] и фитогормональном балансе [10] играет существенную роль в симбиотических отношениях между азотфиксирующими бактериями и растением-хозяином. Молибден является важным компонентом кофакторов ферментов, катализирующих восстановление или фиксацию азота [14]. При внесении восстановленного или органического азота потребность в молибдене уменьшается или исчезает вовсе. Одним из способов, позволяющим избежать подавляющий эффект неорганического азота на образование клубеньков [3], является подача минеральных элементов через листья. Листовая подкормка стимулирует выделение сахаров в корневых эксудатах, что, в свою очередь, положительно влияет на развитие клубеньков [9]. В настоящее время проведено недостаточно исследований влияния P, B и Mo на образование клубеньков и фиксацию атмосферного азота у бобовых.

\* Кафедра физиологии растений РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева.

Целью наших исследований стало изучение влияния Р, В и Мо на процессы образования клубеньков и азотфиксации у гороха и сои.

Задачи исследований: изучение изменения концентрации специфических флавоноидов в корневых экссудатах, играющих роль индукторов при образовании клубеньков; определение количества клубеньков и активности фиксации азота в условиях повышенного или пониженного содержания Р, а также В- и Мо-дефицита.

### Методика

Влияние оптимального содержания Р для питания растений (1 mM), недостаток Р (0,1 mM) и избыток Р (3 mM) изучали на инокулированных растениях гороха сорта Богатырь, выращенных на полной питательной среде Yamagishi и Yamamoto [19]. Исследования влияния недостатка содержания Мо на образование клубеньков и азотфиксацию проводили на растениях гороха сорта Авола, выращенных на полном питательном растворе Гельригеля с добавкой микроэлементов согласно Хогленда и Арнона [6] и в условиях отсутствия Мо в питательной смеси в опытных вариантах. Ростки гороха инокулировали бактериальной суспензией ( $10^8$  клеток  $\text{ml}^{-1}$ ) *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*, штамм D 293 и помещали в сосуды объемом 1,2 L. Растения выращивали в течение 35 дней как водные культуры. Листовая подкормка Agroleaf® (компания Скотте, США) содержит основные макроэлементы в сбалансированном соотношении N:P:K=20:20:20 + микроэлементы без Мо. Листовую подкормку (0,3%) путем опрыскивания и смену питательных растворов проводили 2 раза в неделю. Влияние дефицита В изучали на растениях сои, инокулированных *Bradyrhizobium japonicum*, штаммом 639 и выращенных на питательной среде Yamagishi и Yamamoto [19]. В контрольных вариантах В подавали в виде  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , с концентрацией 44  $\mu\text{g}$  В/L. В

опытных вариантах исключили бор на 30 дней. Повторность вариантов 4-кратная. Нитрогеназную активность определяли методом восстановления ацетилена [5]. Для получения корневых экссудатов использовали методику инфльтрации метанолом [16]. Опыты проводили на жидкостном хроматографе Perkin Elmer с детектором ( $\lambda$ -340 нм) и аналитической колонкой Kromasil LC 18 с размерами 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm методом жидкостной хроматографии с высокой разделительной способностью (HPLC). Объем пробы — 20  $\mu\text{l}$ , скорость разделения — 1 ml/min, растворитель — метанол : вода : уксусная кислота (5 : 93 : 2). Содержание свободных аминокислот определяли методом HPLC, новым способом [11]. Результаты представлены в виде: среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка. Сравнение средних значений выполнено с применением теста Фишера ( $P \leq 0,05$ ).

### Результаты

Исследования показали, что дефицит содержания фосфора в питательном растворе опытных вариантов сильно подавляет образование клубеньков и активность азотфиксации в сравнении с контролем (табл. 1). Растения, выращенные в условиях повышенного содержания фосфора, также образуют большее количество клубеньков, но активность их азотфиксации была меньше, чем у контрольных. Фосфор оказывает влияние на симбиотическую фиксацию азота своими структурными клеточными функциями и значением для роста и развития растений. Фосфор необходим при протекании высокоэнергетического процесса азотфиксации. Мобилизация минеральных фосфатов почвы в процессе жизнедеятельности микроорганизмов, в т. ч. и бактерий рода *Rhizobium* изучена в работе Мишустина и др. [2]. Работы по исследованию влияния дефицита фосфора на образование нормально функционирующих клубеньков проводили и

другие авторы [8]. Значительное замедление азотфиксирующей активности и уменьшение количества клубеньков наблюдается у растений, выращенных без молибдена, традиционным корневым питанием, в то время как у молибдендефицитных растений с применением листовой подкормки активность нитрогеназы и число клубеньков снижается в меньшей степени по сравнению с растениями с корневым питанием, выращенных без молибдена (табл. 1). Поскольку в нашем листовом препарате азот присутствует как в форме нитрата, так и в форме аммония, можно ожидать, что растения с листовым питанием не будут показывать такую высокую требовательность к молибдену. Благоприятное влияние листовой подкормки на развитие азотфиксирующих бактерий за счет повышения содержания сахаров в корневых эксудатах установлено и другими исследователями [9]. В условиях 30-дневного бороголодания у инокулированных растений сои наблюдается не только снижение скорости роста, но и значительное уменьшение количества клубеньков, а также снижение азотфиксирующей активности (таблица). Причиной пониженной активности могут быть замедленный транспорт сахаров от корней к клубенькам и замедленный экспорт продуктов азотфиксации. Механизм регуляции азот-

фиксации по принципу обратной связи изучали разные исследователи [18].

Установлено, что в условиях фосфорного и борного дефицита изменяется содержание специфических флавоноидов (pod-индукторов) в корневых эксудатах растений [15]. Хроматографский анализ флавоноидов в эксудатах корней показал, что в отличие от контрольных растений (рис. 1А), в условиях фосфорного дефицита количество пиков не меняется, но наблюдается определенное понижение абсорбции (рис. 1Б).

Среди исследованных флавоноидов апигенин и нарингенин являются основными pod-генными индукторами для азотфиксирующих бактерий гороха. В условиях фосфорного избытка концентрация апигенина ниже, чем в контроле, а пик нарингенина не наблюдается вовсе (рис. 1В). Участие бора в фенольпропаноидном пути имеет важное значение в начальном этапе инфицирования, когда происходит активирование бактерий растительными флавоноидами и экспрессия ризобияльных pod-генов [4]. Анализ флавоноидов в эксудатах корней, изолированных из пятидневных ростков сои, показал, что концентрация фенольных соединений сильно уменьшается в условиях бороголодания (рис. 1Е) по сравнению со стандартными (рис. 1Г) и контрольными растениями (рис. 1Д).

**Влияние разных уровней Р, Мо и В на  $N_2$ -фиксирующую активность и число клубеньков у гороха и сои**

Условия опыта		$N_2$ -фиксирующая активность [ $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g FW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ]	Количество клубеньков
Р	0,1 мМ	83±17,05	79±4,0
	1,0 мМ	336±20,12	117±5,4
	3,0 мМ	205±23,00	131±10,0
Мо	0,17 $\mu\text{M}$ корневое питание	35,16±1,76	87±4,4
	0,17 $\mu\text{M}$ комбинированное питание	41,24±2,06	54±2,7
	0,00 $\mu\text{M}$ корневое питание	0,69±0,03	32±1,6
	0,00 $\mu\text{M}$ комбинированное питание	13,99±0,70	46±2,3
В	44,0 $\mu\text{M}$	7,78±0,50	60,1±1,3
	0,00 $\mu\text{M}$	2,27±0,25	34,3±0,9

**Примечание.** Результаты представлены в виде: среднее значение ± стандартная ошибка. Различия между средними значениями достоверны при уровне значимости  $P \leq 0,05$ .

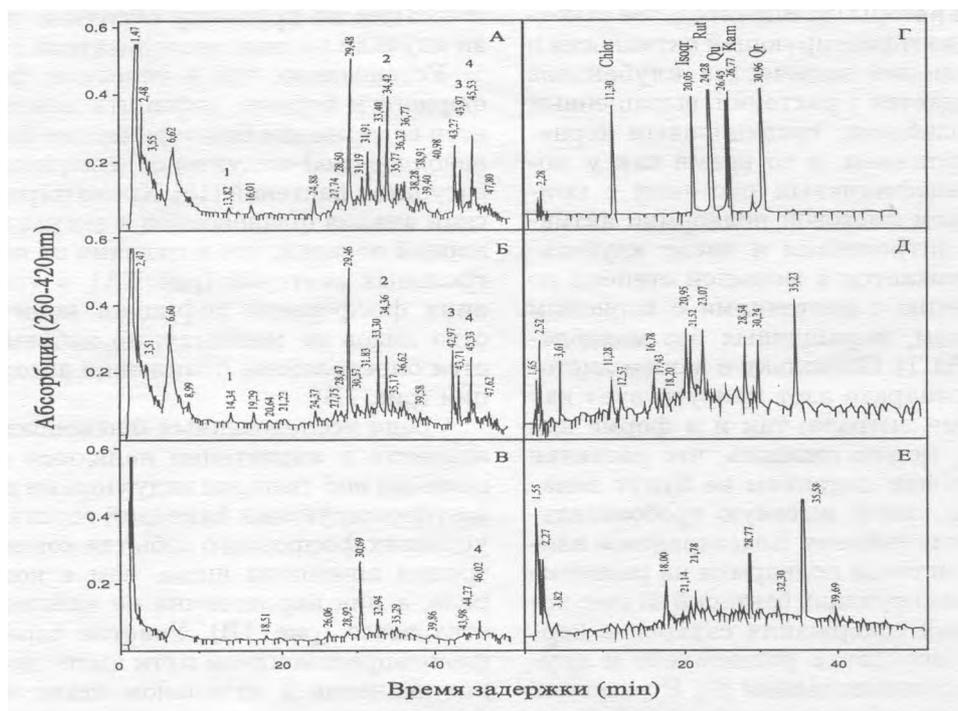


Рис. 1. Хроматографический (HPLC) анализ флавоноидов в экссудатах корней в условиях разного уровня фосфорного (А, Б, В) и борного (Г, Д, Е) содержания

Общее содержание аминокислот у растений, выращенных без Мо, уменьшается преимущественно в листьях (рис. 2). Содержание аминокислот в

корнях у молибдендефицитных растений стало выше, чем у растений, выращенных в присутствии Мо. Увеличение содержания аминокислот в кор-

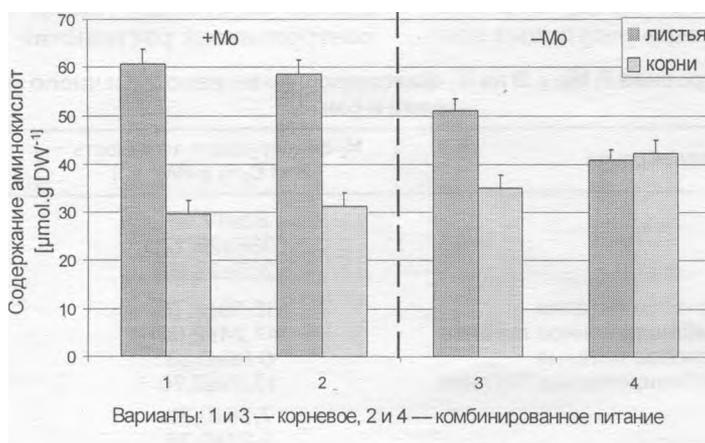


Рис. 2. Общее содержание аминокислот у растений гороха, выращенных в присутствии и отсутствии молибдена

нях молибдендефицитных растений с применением листовой подкормки больше, чем у растений с корневым питанием.

### Выводы

1. Недостаток бора, фосфора и молибдена оказывает отрицательное воздействие на образование клубеньков и на активность азотфиксации у бобовых растений.

2. Анализ результатов показал, что существует непосредственная связь между содержанием фосфора и бора в питательной среде и изменением количества специфических флавоноидов в корневых эксудатах, играющих роль индукторов для образования клубеньков у бобовых.

3. Уменьшение количества клубеньков, понижение активности азотфиксации и содержания аминокислот в растительных тканях при отсутствии молибдена в питательной среде можно избежать подачей питательных элементов через листья.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Жизневская Г.Я* Медь, молибден и железо в азотном обмене бобовых растений. М.: Наука, 1972. — 2. *Мишустин Е.Н., Геллер И.Т., Синха М.* Мобилизация минеральных фосфатов почвы и удобрений в процессе жизнедеятельности микроорганизмов // Изв. ТСХА, 1972. Вып. 4. С. 116-121. — 3. *Посыпанов Г.С., Баткова Т.В., Чернова В.И.* Биологическая фиксация азота воздуха клевером луговым в зависимости от состава фитоценоза и уровня минерального питания // Изв. ТСХА, 1991. Вып. 2. С. 59-64. — 4. *Denarie J., Debelle F., Rosenberg D.* // Ann. Rev. Microbiol., 1992. Vol. 46. P. 497-531. — 5. *Hardy R.F. W., Holstain D., Jackson E., Burris R.* // Plant Physiol., 1973. Vol. 43. P. 1185-1207. — 6. *Hoagland D.R., Amon D.I.* // Calif. Agr. Exp. Sta. Circ., 1950. 347. 1-39. — 7. *Hu H, Brown P.* // Plant Physiol., 1994. Vol. 105. P. 681-689. — 8. *Israel D.W.* // Physiologia Plantarum, 1993. Vol. 88. P. 294-300. — 9. *Kuepper G.* // National Sustainable Agriculture Information Service NCAT Agriculture Specialist March, 2003. — 10. *Lewis D.* // New Phytol., 1980. Vol. 84. P. 209-229. — 11. *Lozanov V., Petrov S., Mitev V.* // J. Chromatogr., 2004. Vol. 1025. P. 201-208. — 12. *McKay I.A., Djordjevic M.I.* // App. Environ. Microbiol., 1993. Vol. 59. P. 3385-3392. — 13. *Marschner H.* // Mineral nutrition of higher plants. Academic press, London, 1995. — 14. *Mendel R.R., Hansch R.* // J. Exp. Bot., 2002. Vol. 53. P. 1689-1698. — 15. *Phillips D.A., Dakora F.D., Sande E.* // Plant Soil, 1994. Vol. 16. P. 69-80. — 16. *Streeter J. S., Salminen S.* // J. Exp. Bot., 1993. Vol. 44(261). P. 821-828. — 17. *Thorne S. H., Williams H. D.* // J. Bacteriol., 1997. Vol. 179. P. 6894-6901. — 18. *Vadez V., Sinnclar R., Serraj R.* // Physiol. Plantarum, 2000. Vol. 110. P. 215-223. — 19. *Yamagishi M., Yamamoto Y.* // Soil Sci. Plant Nutr., 1994. Vol. 40(2). P. 265-274.

### SUMMARY

The effects of P deficiency and excess, deficiency of B and Mo on the formation of nodules and nitrogen fixing activity in pea and soybean plants were studied. It was shown that a close relationship between P and B concentration in the nutrient media and some flavonoids in the root exudates could exist. Plant flavonoids appeared to play a role in the induction of nodule formation. The negative influence of Mo exclusion from the nutrient media on the nodule function, nitrogen fixation and amino acid content diminished through the foliar absorbed nutrients.