

УДК 631.82:631.432.2:633.34:631.445.4

## ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ В РИЗОСФЕРЕ СОИ ПРИ ПОЧВЕННОЙ ЗАСУХЕ

*Е. ЕМНОВА, С. ТОМА, О. ДАРАБАН, Я. БЫЗГАН*

*Институт генетики, физиологии и защиты растений Академии Наук Молдовы*

**Abstract:** Rhizosphere microorganisms and plant roots can secrete enzymes-hydrolases into the soil. Soil moisture is one of the strongest factors which influence its enzymatic activity. Exohydrolase activity can serve as an indicator of both the water regime and available nutrient requirements of plants. The aim of this study was to analyze the enzyme activity in the rhizosphere soil and roots of soybean cultivated under soil drought conditions. The changes of urease and dominant phosphatase activities reliably reflected physical and chemical properties of the soil in the “critical” developmental stages of soybean plants. The analysis of the activity of these enzymes, measured during flowering and pod formation stages, can indicate about the effectiveness of different methods being proposed to increase plant tolerance to soil moisture deficit.

**Key words:** *Glycine max*; Calcareous chernozem; Drought; Enzyme activity; Rhizosphere; Urease; Phosphatase

**Реферат:** Ризосферные микроорганизмы и корни растений могут секретировать в почву ферменты-гидролазы. Влажность почвы является одним из наиболее сильных факторов, влияющих на ее ферментативную активность. Активность экзогидролаз может служить своего рода индикатором, как водного режима, так и потребности растений в доступных элементах питания. Целью настоящего исследования являлся анализ ферментативной активности в ризосферной почве и корнях сои, возделываемой в условиях почвенной засухи. Изменения уреазной и доминирующих фосфатазных активностей достоверно отражали особенности физических и химических свойств почвы в «критические» фазы развития растений сои. Анализ активности указанных ферментов, измеренных в период фаз цветения и образования стручков, может свидетельствовать об эффективности различных методов, предлагаемых для повышения толерантности растений сои к дефициту почвенной влаги.

**Ключевые слова:** *Glycine max*; Чернозем карбонатный; Засуха; Ферментативная активность; Ризосфера; Уреаза; Фосфатаза

### ВВЕДЕНИЕ

Соя известна богатством экономически ценных компонентов, содержащихся в зерне, благодаря которому ее рассматривают как «антикризисную» культуру. В Ставропольском регионе России (зоне неустойчивого увлажнения) затраты на производство этой культуры окупаются стоимостью 5-7 ц/га продукции. Поэтому даже при невысокой урожайности производство сои может быть рентабельным (Сентябрев, А.А. 2010). В Молдове в связи с частым повторением засушливых лет сою следует активнее включать в севообороты, как для сохранения плодородия почв, так и для обеспечения продовольственной безопасности. Ризосферные микроорганизмы и корни растений могут секретировать в почву ферменты-гидролазы (Хазиев, Ф.Х. 1990; Емнова, Е.Е. 2008; Emnova, E. et al. 2012). Экзогидролазы обеспечивают в ризосферной почве биохимические процессы разложения органических соединений азота и фосфора с образованием доступных растениям и микроорганизмам питательных элементов. Влажность почвы является одним из наиболее сильных факторов, влияющих на ее ферментативную активность (Хазиев, Ф.Х. 1982). Активность экзогидролаз может служить своего рода индикатором, как водного режима, так и потребности растений в доступных элементах питания.

Целью настоящего исследования являлся анализ ферментативной активности в ризосферной почве и корнях сои, возделываемой в условиях почвенной засухи.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В вегетационном опыте (пластиковые сосуды, 5 кг сухой почвы, n=4) моделировали два режима увлажнения почвы: оптимальный – 70% полной влагоемкости ПВ; воддефицитный – 35% ПВ в течение 17 дней), а также два питательных режима (контроль без удобрений – дефицит NР, и с внесением минеральных удобрений, N<sub>50</sub>P<sub>100</sub> мг/кг сухой почвы. Азот вносили в виде кальциевой селитры Са(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, фосфор – соли КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>. Использовали чернозем карбонатный (содержание гумуса 1,85%, значение рН<sub>водный</sub> – 7.93) с научно-экспериментальной

базы Института генетики, физиологии и защиты растений (НЭБ ИГФЗР) АНМ (Кишинев). Семена двух сортов сои (*Glycine max* L) Аура и Клавера (Емнова, Е. И др. 2012), различающихся по толерантности к дефициту почвенной влаги, были обработаны за час до посева суспензией бактерий *Bradyrhizobium japonicum* 646 ( $10^7$  клеток/г сухих семян). Водный стресс и последующий отбор образцов почвы и корней сои проводили в фазе цветения растений сои. В полевом мелкоделяночном опыте (НЭБ ИГФЗР АНМ) в условиях засухи 2012 г. изучали эффект стартовых доз ( $N_{20}$ , кг/га) двух видов азотных удобрений (мочевина, селитра аммиачная) на ферментативную активность ризосферной почвы и корней сои сортов Аура и Индра в фазах цветения (19% ПВ) и формирования бобов (33% ПВ). Почва – чернозем карбонатный (содержание гумуса 2,66%, значение  $pH_{водный}$  – 7.61). В качестве фосфорного удобрения использовали суперфосфат простой ( $P_c 60$ , кг/га). Почву для анализа собирали стряхиванием слоя, прилегающего к корням. Просеивали ее через сито с диаметром 2 мм, удаляли растительные остатки, и хранили до анализа в холодильнике при  $+4^{\circ}C$  (Хазиев, Ф.Х. 1990; Емнова, Е. И др. 2012). Отмытые корни (1 г) растирали на льду в фарфоровой ступке с измельченным стеклом в охлажденном ( $+4^{\circ}C$ ) буферном или физиологическом растворе (Ермаков, А.И., Арасимович, В.В. 1987).

Активности уреазы (КФ 3.5.1.16), протеазы (КФ 3.5.1.16) в ризосферной почве и корнях сои определяли спектрометрическими методами с использованием реактивов Несслера (Практикум по агрохимии 1989; Хазиев, Ф.Х. 1990) и Фолина-Чиокалтеу (Alef, K., Nannipieri, P. 1995), соответственно. Активности кислой (КФ 3.1.3.2) и щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) определяли в присутствии буферных растворов, рекомендованных для почвы и корней. Использовали двунариевую соль п-нитрофенил-фосфата ( $pNP-Na_2$ ) в качестве субстрата (Alef, K., Nannipieri, P. 1995). Экспериментальные данные обрабатывали с использованием программ Excel Microsoft Office XP и Statistica 7. Средние значения ( $n=4$ ) показателей оценивали с помощью стандартного отклонения ( $y$ ). Статистическую значимость влияния изучаемых факторов на измеряемые показатели проверяли с помощью t-критерия Стьюдента и НСР Фишера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В вегетационном опыте протеазная активность ризосферной почвы практически не менялась в контрастных условиях водного и питательного режима (Табл. 1). Уреазная активность ризосферной почвы при оптимальном уровне влажности (70% ПВ) достоверно возрастала при внесении кальциевой селитры на 7–8 % под обоими сортами сои по сравнению с контролем без удобрений.

При возникновении водного дефицита (35% ПВ) в фазе цветения сои, уреазная активность в ризосферной почве также достоверно возрастала, в то время как активность доминирующей щелочной фосфатазы снижалась в ответ на ухудшение водного режима почвы. В целом, хотя изучаемые факторы – удобрения и уровень почвенной влажности, статистически достоверно ( $p < 0,05$ ) влияли на уровень изучаемой ферментативной активности, количественно изменения после 17-суточного водного стресса были не велики.

Активности упомянутых ферментов в корнях растений сои в фазе цветения реагировали на изменения изучаемых факторов количественно более выражено. Активность уреазы в тонких корнях сои возрастала почти вдвое при внесении удобрений ( $N_{50}P_{100}$ , мг/кг сухой почвы) (Табл. 1). Активность доминирующей в корнях кислой фосфатазы снижалась заметно при внесении удобрений, однако, при дефиците почвенной влаги в удобряемых вариантах достоверно возрастала, отражая возросшую потребность в энергии для метаболических перестроек. Сорт Аура, более продуктивный, но и более чувствительный к дефициту увлажнения, в сравнении с сортом Клавера, показал более высокий уровень ферментативной активности в корнях. Таким образом, уреазная активность в фазе цветения играет более существенную роль в азотном метаболизме сои, по сравнению с протеазной, и заметно реагирует на изменения физико-химических свойств почвы. Изменения активностей доминирующих фосфатаз также информативны и могут свидетельствовать об эффективности тех или иных испытываемых приемов повышения толерантности растений сои к дефициту увлажнения (например, предпосевное внесение адекватных форм и доз минеральных питательных элементов).

**Таблица 1. Ферментативная активность в ризосферной почве и корнях сои (вегетационный опыт 2011 г, фаза цветения сои)**

| Сорт сои  | % ПВ  | Уреаза      | Протеаза  | Фосфатаза |           |             |
|---|---|-------------|-----------|-----------|-----------|-------------|
|   |   |             |           | кислая    | щелочная  | общая       |
| Среднее значение ± стандартное отклонение (n=4) |   |             |           |           |           |             |
| Ризосферная почва                               |   |             |           | pH 5.0    | pH 10.2   | ест. pH 7,6 |
| Аура  | контроль без удобрений  |             |           |           |           |             |
|   | 70  | 163±3       | 34,8±6,2  | 136±5     | 228±5     | 189±13      |
|   | 35  | 187±4***    | 30,9±3,6  | 134±12    | 189±14*** | 167±11***   |
|   | N <sub>50</sub> P <sub>100</sub> , мг/ кг сухой почвы (селитра кальциевая)              |             |           |           |           |             |
|   | 70  | 175±3       | 33,8±6,3  | 114±6     | 215±8     | 159±5       |
|   | 35  | 180±1***    | 33,5±4,4  | 113±12    | 198±5***  | 151±12      |
| Клавера   | контроль без удобрений  |             |           |           |           |             |
|   | 70  | 165±3       | 35,7±4,2  | 116±8     | 225±7     | 172±6       |
|   | 35  | 173±3***    | 33,0±4,9  | 112±6     | 196±5***  | 156±10***   |
|   | N <sub>50</sub> P <sub>100</sub> , мг/ кг сухой почвы (селитра кальциевая)              |             |           |           |           |             |
|   | 70  | 179±2       | 34,4±4,9  | 122±8     | 212±4     | 182±14      |
|   | 35  | 184±2***    | 31,2±4,4  | 119±7     | 210±7     | 167±17***   |
| <b>Корни сои</b>                                |   |             |           | pH 5.3    | pH 8.75   | ест. pH     |
| Аура  | контроль без удобрений  |             |           |           |           |             |
|   | 70  | 788±37      | 7,7±0,8   | 401±32    | 91±12     | 209±7       |
|   | 35  | 887±245     | 6,5±0,6*  | 415±71    | 84±12     | 200±18      |
|   | N <sub>50</sub> P <sub>100</sub> , мг кг <sup>-1</sup> сухой почвы (селитра кальциевая) |             |           |           |           |             |
|   | 70  | 1223±107    | 5,2±0,8   | 313±13    | 50±9      | 95±9        |
|   | 35  | 1423±86***  | 4,6±0,4   | 404±16*** | 46±3      | 102±9       |
| Клавера   | контроль без удобрений  |             |           |           |           |             |
|   | 70  | 566±98      | 8,0±1,0   | 362±27    | 82±7      | 232±11      |
|   | 35  | 905±255***  | 6,2±0,7** | 377±18    | 73±3***   | 208±17***   |
|   | N <sub>50</sub> P <sub>100</sub> , мг кг <sup>-1</sup> сухой почвы (селитра кальциевая) |             |           |           |           |             |
|   | 70  | 1077±116    | 5,7±0,8   | 264±30    | 40±8      | 120±26      |
|   | 35  | 1386±149*** | 4,9±0,3   | 288±24*   | 34±3*     | 116±10      |

**Примечания:** ПВ - полная влагоемкость почвы, %. Активность выражена: Уреаза – мкг NH<sub>4</sub><sup>+</sup> / г сухой почвы или корней / час. Протеаза – мкг и мг тирозина / г / час, соответственно, для почвы и корней. Фосфатаза – мкг и мг п-нитрофенола / г / час, соответственно, для почвы и корней. Знак \* - оценка статистической значимости различия средних значений изучаемых показателей при 35% ПВ versus 70% ПВ по t-критерию Стьюдента. \*(p<0.05); \*\*\*(p<0.001); \*\*\*(p<0.001).

В полевом мелкоделяночном опыте в фазе цветения сои, совпавшей с жестким дефицитом увлажнения почвы (19% ПВ), потенциальная уреазная активность ризосферной почвы была низкой, однако, не потеряла способности к восстановлению в последующей фазе образования бобов при улучшении водного режима (33% ПВ), благодаря выпавшим осадкам (Табл. 2). Активность корневых ферментов более сильно реагировала на уровень почвенной влажности. При использовании минеральных NP удобрений активность уреазы в корнях растений сои, по-видимому, играет одну из ключевых ролей в азотном метаболизме, именно в фазе цветения. В этот период она достигала максимальных значений: 1077–1423 мкг NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/ г сухих корней/ час в вегетационном опыте (70% и 35% ПВ) и 1241–1294 мкг NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/ г сухих корней/ час в полевом опыте (19% ПВ). В фазу образования стручков, при повышении влажности почвы до 33% ПВ активность корневой уреазы снижалась примерно в 5 раз (Табл. 2). Таким образом, хотя уровень увлажнения почвы достоверно влиял на активность корневой уреазы в фазе цветения (повышение активности при дефиците почвенной влаги), смена фазы развития сои оказывала еще более сильное влияние на этот фермент.

Активность доминирующей кислой фосфатазы из корней сои в период острого дефицита почвенной влаги в фазе цветения не проявила количественной статистически достоверной зависимости от вида азотных удобрений, но значимо зависела от сорта сои. После выпадения

**Таблица 2.** Ферментативная активность в ризосферной почве и корнях сои в условиях засухи (полевой опыт 2012 г, фазы цветения - 19% ПВ и образования бобов - 33% ПВ)

| Сорт сои  | %, ПВ | Удобрения, N20P60, кг/га | <sup>1</sup> Уреаза | <sup>2</sup> Фосфатаза |            |              |
|---|-------|--------------------------|---------------------|------------------------|------------|--------------|
|   |       |                          |                     | кислая                 | щелочная   | общая        |
| Среднее значение ± стандартное отклонение (n=4) |       |                          |                     |                        |            |              |
| <b>Ризосферная почва</b>                        |       |                          |                     | pH 5,0                 | pH 10,2    | pH П 7,6-7,8 |
| Аура  | 19    | мочевина                 | 46±1                | 97±3 а                 | 283±4 а    | 110±6        |
|   |       | селитра аммиачная        | 47±4                | 85±6 б                 | 265±8 б    | 108±2        |
|   | 33    | мочевина                 | 102±4               | 144±8                  | 389±6      | 129±3        |
|   |       | селитра аммиачная        | 102±3               | 149±8                  | 404±18     | 137±11       |
| Индра   | 19    | мочевина                 | 44±1                | 89±6 а                 | 279±9 а    | 114±6 а      |
|   |       | селитра аммиачная        | 46±3                | 98±4 б                 | 302±9 б    | 124±7 б      |
|   | 33    | мочевина                 | 125±4               | 155±7                  | 413±12     | 150±7        |
|   |       | селитра аммиачная        | 120±3               | 158±6                  | 410±9      | 154±8        |
| <b>Корни сои (нелигнифицированные)</b>          |       |                          |                     | pH 5,3                 | pH 8,75    | pH К 5,64    |
| Аура  | 19    | мочевина                 | 1294±37             | 155±1                  | 8,3±0,5 а  | 46,3±2,3 а   |
|   |       | селитра аммиачная        | 1241±23             | 151±8                  | 9,9±0,7* б | 56,2±3,8 б   |
|   | 33    | мочевина                 | 264±6 а             | 171±13                 | 20,3±0,6 а | 113±6 а      |
|   |       | селитра аммиачная        | 227±36 б            | 167±11                 | 18,6±0,8 б | 99 ±7 б      |
| Индра   | 19    | мочевина                 | 1322±21             | 142±11                 | 10,0±0,7   | 50,9±3,2     |
|   |       | селитра аммиачная        | 1264±33             | 156±12                 | 9,6±0,1    | 52,0±2,7     |
|   | 33    | мочевина                 | 257±20 а            | 196±18                 | 19,4±1,1   | 117±6 а      |
|   |       | селитра аммиачная.       | 211±26 б            | 189±8                  | 20,0±0,9   | 96±6 б       |

**Примечания:** Единицы измерения активности ферментов см. под табл. 1. Буквы а и б - оценка статистической значимости различия средних значений изучаемых показателей в вариантах возделывания сои: мочевина versus селитра аммиачная по критерию НСР Фишера ( $p < 0,05$ )

атмосферных осадков в фазе бобообразования зависимость активности корневой кислой фосфатазы от сорта сои отсутствовала, однако у сорта Аура этот фермент достоверно реагировал на вид азотных удобрений. А именно, при использовании мочевины активность корневой кислой фосфатазы была существенно выше ( $p < 0,05$ ) в сравнении с возделыванием сои на фоне селитры аммиачной. Однако при сравнении с сортом Аура, более продуктивный сорт Индра в фазе образования бобов проявлял количественно более высокую активность доминирующих фосфатаз (щелочной в ризосферной почве и кислой – в корнях), которые коррелировали с более низким содержанием подвижного Р в ризосферной почве под ним, особенно при использовании простого суперфосфата в сочетании с мочевиной.

Таким образом, данные о ферментативной активности в ризосфере сои полностью соответствовали концепции о фазах максимального накопления сухой биомассы растений сои: периоды фазы цветения (максимальная потребность в доступном азоте) и фазы формирования бобов (максимальное потребление подвижного фосфора) (Коробко, В.А. 1982).

Ферментативная активность ризосферной почвы и, особенно, тонких нелигнифицированных корней достоверно изменялись в зависимости от физико-химических условий и свойств почвы в критические фазы развития растений сои. Стартовые дозы азотных удобрений способствовали повышению толерантности растений сои к дефициту почвенной влаги. Анализ активности уреазы и доминирующих фосфатаз в ризосферной почве и корнях сои может быть использован для оценки способов повышения толерантности предлагаемых новых сортов сои в зонах неустойчивого земледелия.

## ВЫВОДЫ

Изменения активностей уреазы и доминирующих фосфатаз в ризосферной почве и корнях сои достоверно отражали особенности физико-химических условий и свойств почвы в критические фазы развития растений сои. Анализ активности указанных ферментов в фазы цветения и формирования бобов может свидетельствовать об эффективности тех или иных испытываемых приемов повышения толерантности растений сои к дефициту увлажнения.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. ALEF, K., NANNIPIERI, P., ed., 1995. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. London: Academic Press. 581 p. ISBN 978-0-12-513840-6.
2. EMNOVA, E. et al., 2012. Enzyme activity in soybean root-adhering soil in dependence on nutrition and water content condition. In: *Lucrări științifice, USAMV Iași*, vol. 55(2): Agronomie, pp. 51-54.
3. ЕМНОВА, Е.Е., 2008. Биохимические посредники в системе: растение-почва-микроорганизмы. В: *Mediul Ambient*, nr. 6 (42), pp. 40-45.
4. ЕРМАКОВ, А.И., АРАСИМОВИЧ, В.В., 1987. Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздаг. 430 с.
5. КОРОБКО, В.А., 1982. Соя. В: Ветрова, Е.Г., Голбан, Н.М., Коробко, В.А. *Зернобобовые культуры*. Кишинев: Карта Молдовеняскэ, с. 83-148.
6. МИНЕЕВА, В.Г., ред., 1989. Практикум по агрохимии. Москва: Изд-во МГУ. 304 с.
7. СЕНТЯБРЕВ, А.А., 2010. Соя – «антикризисная» культура. В: *Земледелие*, №3, с. 15-16.
8. ХАЗИЕВ, Ф.Х., 1990. Методы почвенной энзимологии. Москва: Наука. 286 с.
9. ХАЗИЕВ, Ф.Х., 1982. Системно-экологический анализ ферментативной активности почв. Москва: Наука. 203 с.

Data prezentării articolului: 22.01.2014

Data acceptării articolului: 17.04.2014