

## СИМБИОТИЧЕСКАЯ АЗОТФИКСАЦИЯ БОБОВЫМИ РАСТЕНИЯМИ АЛЬПИЙСКИХ ЭКОСИСТЕМ: ВЕГЕТАЦИОННЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ

© 2021 г. М. И. Макаров<sup>а</sup>\*, В. Г. Олимпченко<sup>а</sup>, Т. И. Малышева<sup>а</sup>, А. Г. Зуев<sup>б</sup>, А. В. Тиунов<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
Россия 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

<sup>б</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова,  
Россия 119071 Москва, Ленинский просп., 33

\*e-mail: mtkarov@soil.msu.ru

Поступила в редакцию 06.04.2020 г.

После доработки 30.04.2020 г.

Принята к публикации 19.05.2020 г.

Анализ естественного изотопного состава азота бобовых растений не всегда позволяет рассчитать интенсивность симбиотической фиксации ими атмосферного азота и требует совершенствования. Пять типичных для альпийского пояса Тебердинского заповедника видов бобовых растений (*Anthyllis vulneraria*, *Astragalus levieri*, *Hedysarum caucasicum*, *Oxytropis kubanensis*, *Trifolium polyphyllum*) выращивали из семян в условиях лабораторного вегетационного эксперимента. Показано, что формирование клубеньков на корнях происходит на ранних стадиях их развития; *Trifolium polyphyllum*, не образующий клубеньки в условиях высокогорий, не формирует их и при вегетации в лаборатории. Естественная концентрация <sup>15</sup>N в листьях бобовых растений альпийских экосистем позволяет рассчитать вклад атмосферного N<sub>2</sub> в азотное питание уже в первый год их развития, тогда как изотопный состав азота в корнях не дает такой возможности. При расчете интенсивности фиксации атмосферного азота следует принимать во внимание фракционирование изотопов между симбиотическими бактериями (клубеньками) и растением-хозяином, без учета которого доля фиксированного азота в питании растений может быть занижена.

**Ключевые слова:** азотное питание растений, бобовые растения, фиксированный N<sub>2</sub> атмосферы, естественная концентрация <sup>15</sup>N

DOI: 10.31857/S0367059721010091

Симбиотическая азотфиксация имеет важное значение в функционировании экосистем. Оценки глобального поступления фиксированного из атмосферы N<sub>2</sub> в естественные наземные экосистемы, хотя и различаются в несколько раз в зависимости от использованных методов расчета (от 195 Тг N в год [1] до 128 Тг N в год [2] или даже 44 Тг N в год [3]), свидетельствуют о связывании большого количества атмосферного азота и вовлечении его в биологический круговорот. В частности, в высокогорьях растения, обладающие симбиотической азотфиксацией, доминируют на первых стадиях сукцессий при таянии ледников, обеспечивая аккумуляцию азота в почве и повышая его доступность для растений, поселяющихся позднее [4].

Количественная оценка симбиотической азотфиксации на основе анализа естественного изотопного состава азота растений начала широко применяться в 1970–1980-х гг. Метод основан на том, что концентрация изотопа <sup>15</sup>N в почвенных азотсодержащих соединениях обычно отличается

от его концентрации в атмосферном N<sub>2</sub>. В результате изотопный состав N азотфиксирующих видов, получающих его из почвы и атмосферы, как правило, отличается от изотопного состава N у видов, использующих только его почвенные источники. Это дает возможность рассчитать вклад азотфиксации в азотное питание растений с использованием принципа смешивания изотопов и изотопного масс-баланса [5]. В полевых исследованиях и вегетационных экспериментах были охарактеризованы достоинства и ограничения этого метода оценки доли фиксированного азота в питании растений и его вклада в общий азотный пул почвы в условиях разных экосистем [5, 6].

Для высокогорий, характеризующихся в целом низкой доступностью азота для растений, показано [4, 7–12], что процесс симбиотической азотфиксации активно протекает в условиях низких температур, кислых почв, низкой доступности фосфора и обеспечивает значительную долю азотного питания бобовых (30–100%). Вклад бобовых в приток азота в экосистемы (74–810 мг/м<sup>2</sup>

в год) определяется главным образом их участием в биомассе фитоценоза [7, 8, 13]. Активно фиксирующие атмосферный азот бобовые растения повышают его доступность в почве и таким образом влияют на другие растения в составе альпийского фитоценоза [14].

Несмотря на возрастающее внимание к совершенствованию количественной оценки азота, поступающего в почвы естественных экосистем в результате симбиотической азотфиксации [15], ряд вопросов все еще требует уточнения. В идеале при расчете следует использовать средневзвешенное для всего растения значение  $\delta^{15}\text{N}$ , что при изучении многолетних бобовых растений, формирующих в условиях естественных экосистем мощные глубокие корневые системы, часто оказывается затруднительным. Кроме того, для высокогорных экосистем данные по изотопному составу азота в разных частях бобовых растений (листья, корни, клубеньки) до сих пор чрезвычайно редки, и при оценке доли фиксированного азота часто используется величина  $\delta^{15}\text{N}$  в надземной части растений [7, 12]. Не известно также, насколько быстро формируются клубеньки на корнях многолетних альпийских бобовых растений и в какой степени учет изотопного состава азота в корнях и клубеньках может повлиять на оценку вклада азотфиксации в их питание. Для решения этих вопросов мы провели лабораторный вегетационный эксперимент по выращиванию бобовых растений альпийского пояса Северо-Западного Кавказа из семян и применили метод естественной концентрации  $^{15}\text{N}$  для оценки активности симбиотической фиксации атмосферного азота.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Выращивали пять видов бобовых растений, типичных для наиболее бедных (лишайниковые пустоши) и наиболее богатых (гераниево-копеечниковые луга) элементами минерального питания местообитаний в альпийском поясе Тебердинского заповедника (Северо-Западный Кавказ). К первым относятся *Trifolium polyphyllum*, *Anthyllis vulneraria*, *Astragalus levieri* и *Oxytropis kubanensis*, ко второму – *Hedysarum caucasicum*. В качестве субстрата для выращивания использовали смесь из 50% (по массе) кварцевого песка и 50% гумусового горизонта почвы альпийской лишайниковой пустоши, свойства которой подробно описаны ранее [16]. Семена высаживали в начале мая в 10 вегетационных сосудов объемом 0.8 л для каждого вида. В июле (в возрасте 2.5 мес.) и августе (4 мес.) отбирали образцы растений для анализа (из 5 сосудов в каждый срок). Извлеченные из субстрата растения разделяли на надземную и подземную части, корни тщательно отмывали дистиллированной водой и высушивали. Высушенные образцы взвешивали, измельчали на вибра-

ционной мельнице Retsch MM 200 и анализировали на содержание и изотопный состав азота на элементном анализаторе Thermo Flash 1112 и изотопном масс-спектрометре Thermo Delta V Plus в центре коллективного пользования при Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН.

У двух видов, сформировавших достаточное для проведения анализа количество клубеньков (*Anthyllis vulneraria* и *Hedysarum caucasicum*), клубеньки отделяли от корней, взвешивали и анализировали на содержание и изотопный состав азота как описано выше.

Расчет вклада азотфиксации ( $N_{\text{биол}}$ , %) в состав азота растений осуществляли по формуле

$$N_{\text{биол}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{контр}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{фикс}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{контр}} - \delta^{15}\text{N}_0} \times 100,$$

где  $\delta^{15}\text{N}_{\text{контр}}$  – изотопный состав N у контрольного вида растения, не обладающего симбиотической фиксацией атмосферного  $\text{N}_2$ ;  $\delta^{15}\text{N}_{\text{фикс}}$  – изотопный состав N азотфиксирующего вида;  $\delta^{15}\text{N}_0$  – изотопный состав N азотфиксирующего вида, выращенного на безазотистой среде (учитывает фракционирование изотопов в процессе азотфиксации).

Альпийские экосистемы Тебердинского заповедника являются уникальным примером, когда в качестве контрольного вида предоставляется возможность использовать бобовое растение (*T. polyphyllum*), которое не образует симбиоза с азотфиксирующими бактериями, но таксономически и функционально максимально сходно с азотфиксирующими бобовыми [12]. Это позволяет избежать неопределенности допущений, связанных с выбором контрольного вида [5].

Величина  $\delta^{15}\text{N}_0$  в большинстве исследований экспериментально не определяется, и авторы ориентируются на ранее установленные значения от 0 до  $-1\text{‰}$ , представленные в литературе [4, 10, 12]. Последние исследования подтверждают, что для бобовых растений эта величина, хотя и может несколько отличаться для надземной и подземной частей растений, в целом близка к указанному диапазону [15]. Мы использовали при расчете  $N_{\text{биол}}$  величину  $\delta^{15}\text{N}_0 = -0.6\text{‰}$ , которая дала наилучшее соответствие результатов, полученных для бобовых растений альпийской лишайниковой пустоши в полевых условиях, при использовании методов естественной концентрации  $^{15}\text{N}$  и разбавления изотопной метки  $^{15}\text{N}$  [12].

Для всех результатов рассчитаны средние значения и оценена значимость их различий по  $t$ -критерию.

**Таблица 1.** Масса бобовых растений разного возраста (средние значения  $\pm$  стандартное отклонение,  $n = 5$ ) и формирование ими клубеньков

| Вид                          | Часть растения | Масса одного растения, мг |                  | Количество клубеньков на растение, шт. | Масса одного клубенька, мг |
|------------------------------|----------------|---------------------------|------------------|--|----------------------------|
|                              |                | 2.5 мес.                  | 4 мес.           |  |                            |
| <i>Anthyllis vulneraria</i>  | Надземная      | 89.0 $\pm$ 26.0           | 103.5 $\pm$ 24.9 | 15–25                                  | 0.1                        |
|                              | Подземная      | 19.0 $\pm$ 8.7            | 20.5 $\pm$ 6.4   |  |                            |
| <i>Astragalus levieri</i>    | Надземная      | 14.2 $\pm$ 7.1            | 22.4 $\pm$ 4.1*  | 1–4                                    | 0.2                        |
|                              | Подземная      | 3.2 $\pm$ 0.8             | 6.1 $\pm$ 0.9*   |  |                            |
| <i>Hedysarum caucasicum</i>  | Надземная      | 34.6 $\pm$ 7.1            | 50.9 $\pm$ 6.1*  | 3–8                                    | 0.3                        |
|                              | Подземная      | 27.9 $\pm$ 4.4            | 49.4 $\pm$ 10.1* |  |                            |
| <i>Oxitropis kubanensis</i>  | Надземная      | 14.6 $\pm$ 1.3            | 13.7 $\pm$ 1.7   | 1–3                                    | 0.2                        |
|                              | Подземная      | 4.0 $\pm$ 1.0             | 4.5 $\pm$ 1.3    |  |                            |
| <i>Trifolium polyphyllum</i> | Надземная      | 36.1 $\pm$ 5.1            | 75.6 $\pm$ 17.7* | 0                                      | 0                          |
|                              | Подземная      | 7.8 $\pm$ 2.1             | 19.4 $\pm$ 6.4*  |  |                            |

\* Биомасса растений разного возраста значительно различается при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Формирование биомассы растений и клубеньков

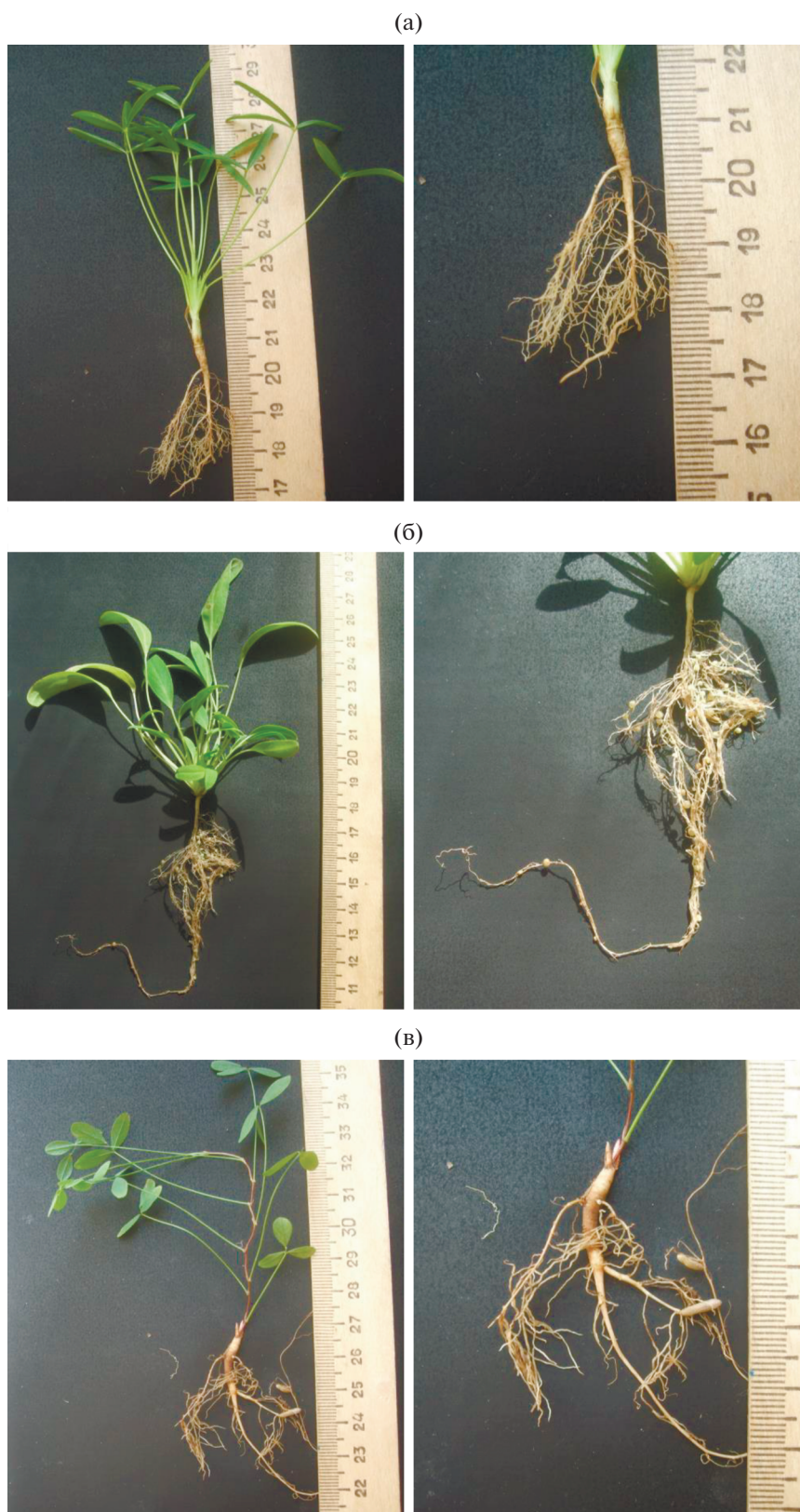
Разные виды формировали разную биомассу (рис. 1, табл. 1). Наиболее активно рос *A. vulneraria*, сформировав через 2.5 мес. растения со средней биомассой около 90 мг в надземной части и около 20 мг – в подземной. В 2.5 раза меньшую надземную биомассу формировали *H. caucasicum* и *T. polyphyllum*. У последнего вида подземная биомасса, как и у *A. vulneraria*, была примерно в 4.5 раза меньше надземной, тогда как у *H. caucasicum* надземная и подземная биомассы почти не различались. Наименьшую биомассу сформировали два вида, наиболее активно фиксирующие атмосферный азот в полевых условиях [12], – *A. levieri* и *O. kubanensis*. Надземная часть этих растений весила около 14 мг, а подземная – всего 3–4 мг.

В возрасте 4 мес. биомасса растений одних видов увеличилась, тогда как других – нет (см. табл. 1). К последним относятся как активно росший в первые 2.5 мес. *A. vulneraria*, так и *O. kubanensis*, показавший низкий рост. Другие виды увеличили свою биомассу в 1.5–2 раза как в надземной части, так и в подземной. Таким образом, молодые бобовые растения первого года отличаются от многолетних растений малой аккумуляцией подземной биомассы (по результатам раскопок корневой системы *H. caucasicum* в полевых условиях соотношение надземной и подземной биомассы составило в среднем 1 : 5).

На корнях молодых растений наблюдалось образование клубеньков, но разной численности и разных размеров (см. рис. 1, табл. 1). Исключение составил *T. polyphyllum*, на корнях которого клубеньки не образовывались. Ранее мы показали, что *T. polyphyllum* не образует клубеньки и не об-

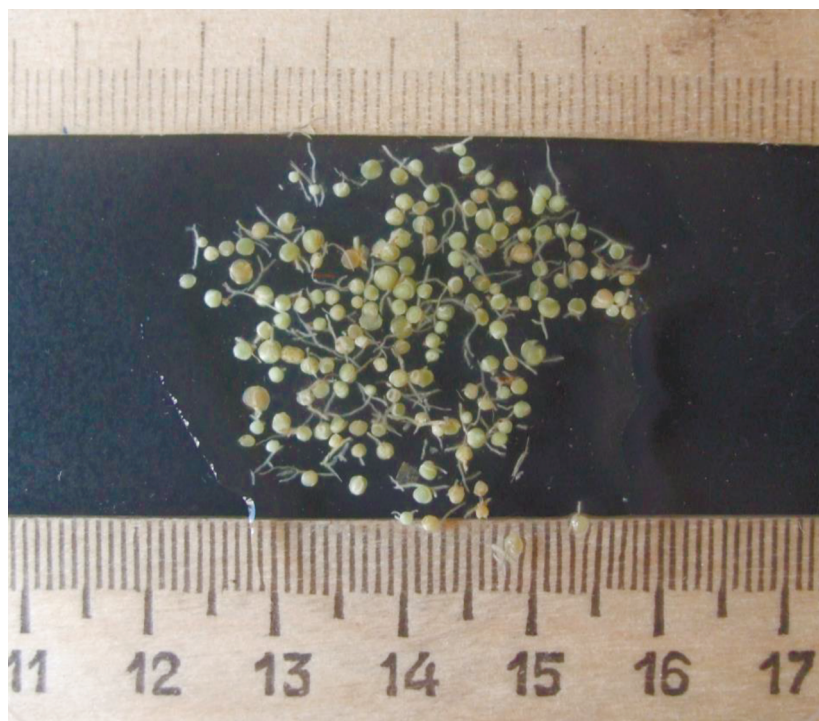
ладает симбиотической азотфиксацией в условиях альпийской лишайниковой пустоши [12], а также не начинает проявлять эти признаки при повышении доступности фосфора и уменьшении кислотности почвы [17]. Теперь мы получили свидетельство того, что клубеньки не образуются и при более высокой температуре вегетации в сравнении с полевыми условиями. Таким образом, подтверждается уникальное для травянистых вне-тропических бобовых явление – *T. polyphyllum* можно считать единственным известным нам исключением из общепринятого представления, что все они являются облигатными симбиотрофами-азотфиксаторами [18]. В частности, все близкие родственники *T. polyphyllum* в высокогорьях других горных систем интенсивно фиксируют азот (*T. alpinum* в Швейцарских Альпах [19]; *T. dasyphyllum* в Скалистых горах Колорадо [7, 20]).

Ни число, ни размер клубеньков, сформировавшихся на растениях в возрасте 2.5 мес., через 1.5 мес. не изменились. Наибольшее их количество сформировалось на корнях *A. vulneraria* (15–25 на растение), меньше их было у *H. caucasicum* (3–8) и еще меньше – у *A. levieri* и *O. kubanensis* (1–4) (см. табл. 1). Обильные шаровидные клубеньки на корнях *A. vulneraria* были мелкими (средний диаметр 1 мм и масса 0.1 мг), тогда как редкие эллипсоидные клубеньки на корнях других видов растений были заметно крупнее, достигая в длину 3–5 мм при средней массе 0.2–0.3 мг. Наиболее крупными были клубеньки у *H. caucasicum* (рис. 2, табл. 1). В полевых условиях показана 10-кратная разница в массе мелких клубеньков у *A. vulneraria* и крупных у *O. kubanensis* [12].



**Рис. 1.** Бобовые растения, выращенные из семян в лабораторном вегетационном эксперименте: а – *Trifolium polyphyllum*, б – *Anthyllis vulneraria*, в – *Hedysarum caucasicum*.

(а)



(б)



Рис. 2. Клубеньки *Anthyllis vulneraria* (а) и *Hedysarum caucasicum* (б).

**Таблица 2.** Концентрация и изотопный состав азота бобовых растений (средние значения ± стандартное отклонение, n = 5)

| Вид                          | Часть растения | N, %                      |                            | δ <sup>15</sup> N, ‰      |                             | Распределение N по частям растения, % |       |           | N <sub>биол.</sub> % |
|------------------------------|----------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|-------|-----------|----------------------|
|                              |                | 2.5 мес.                  | 4 мес.                     | 2.5 мес.                  | 4 мес.                      | надземная                             | корни | клубеньки |                      |
| <i>Anthyllis vulneraria</i>  | Надземная      | 2.96 ± 0.12 <sup>a</sup>  | 2.33 ± 0.21 <sup>ар*</sup> | -0.52 ± 1.45 <sup>a</sup> | -1.19 ± 0.54 <sup>a</sup>   | 81                                    | 16    | 3         | -/51 <sup>**</sup>   |
|                              | Корни          | 2.67 ± 0.11 <sup>б</sup>  | 2.33 ± 0.05 <sup>а*</sup>  | 4.95 ± 1.21 <sup>б</sup>  | 3.21 ± 0.28 <sup>б*</sup>   |                                       |       |           |                      |
|                              | Клубеньки      | —                         | 4.94 ± 0.04 <sup>б</sup>   | —                         | 8.45 ± 0.44 <sup>б</sup>    |                                       |       |           |                      |
| <i>Astragalus levieri</i>    | Надземная      | 4.24 ± 0.12 <sup>в</sup>  | 3.45 ± 0.32 <sup>в*</sup>  | 0.32 ± 0.31 <sup>a</sup>  | -0.21 ± 0.24 <sup>г</sup>   | 86                                    | 14    | Не опр.   | 55/39                |
|                              | Корни          | 3.83 ± 0.40 <sup>вс</sup> | 3.41 ± 0.13 <sup>в</sup>   | -0.08 ± 0.40 <sup>a</sup> | -0.88 ± 0.58 <sup>ар</sup>  |                                       |       |           |                      |
| <i>Hedysarum caucasicum</i>  | Надземная      | 3.21 ± 0.12 <sup>гж</sup> | 2.80 ± 0.28 <sup>г</sup>   | -0.45 ± 0.52 <sup>a</sup> | -0.93 ± 0.31 <sup>a</sup>   | 65                                    | 29    | 6         | 15/32                |
|                              | Корни          | 1.76 ± 0.06 <sup>д</sup>  | 1.81 ± 0.10 <sup>д</sup>   | -0.04 ± 0.42 <sup>a</sup> | -0.77 ± 0.41 <sup>ар</sup>  |                                       |       |           |                      |
|                              | Клубеньки      | —                         | 4.59 ± 0.09 <sup>е</sup>   | —                         | 4.70 ± 0.37 <sup>д</sup>    |                                       |       |           |                      |
| <i>Oxitropis kubanensis</i>  | Надземная      | 3.73 ± 0.12 <sup>е</sup>  | 3.30 ± 0.25 <sup>в</sup>   | 0.37 ± 0.32 <sup>a</sup>  | -0.58 ± 0.39 <sup>ар*</sup> | 83                                    | 17    | Не опр.   | 34/18                |
|                              | Корни          | 3.30 ± 0.20 <sup>ж</sup>  | 3.62 ± 0.27 <sup>в</sup>   | 0.21 ± 0.24 <sup>a</sup>  | -0.97 ± 0.77 <sup>ар*</sup> |                                       |       |           |                      |
| <i>Trifolium polyphyllum</i> | Надземная      | 2.89 ± 0.21 <sup>аб</sup> | 1.96 ± 0.14 <sup>д*</sup>  | -0.08 ± 0.39 <sup>a</sup> | -1.20 ± 0.15 <sup>а*</sup>  | 83                                    | 17    | —         | —                    |
|                              | Корни          | 2.94 ± 0.13 <sup>а</sup>  | 2.23 ± 0.06 <sup>а*</sup>  | 0.03 ± 0.40 <sup>a</sup>  | -0.17 ± 0.46 <sup>г</sup>   |                                       |       |           |                      |

Примечание. Одинаковые буквенные индексы в пределах столбца показывают отсутствие значимых различий при P < 0.05; \* — показатели у растений разного возраста значительно различаются при P < 0.05; \*\* — рассчитано по изотопному составу азота надземной части (над чертой) и всего растения (под чертой).

*Концентрация и изотопный состав азота*

Концентрация азота в надземной части 2.5-месячных растений составила от 2.89% у *T. polyphyllum* до 2.96–4.24% у других видов (табл. 2). Эти значения оказались выше, чем у растений, произрастающих в естественных условиях (2.05 и 2.64–3.30% соответственно [12]). В отличие от надземной части концентрация азота в корнях *T. polyphyllum* (2.94%) не была минимальной. У двух фиксирующих азот видов она была меньше (*H. caucasicum* — 1.76%, *A. vulneraria* — 2.76%), а у двух других больше (*O. kubanensis* — 3.30%, *A. levieri* — 3.83%), чем у *T. polyphyllum*. Как и для надземной части, концентрация азота в многолетних корнях бобовых растений в условиях альпийских экосистем, согласно нашим неопубликованным данным, была заметно меньше: минимальная концентрация в корнях *T. polyphyllum* — 0.93% и 1.92–2.03% — в корнях других бобовых.

Клубеньки *A. vulneraria* и *H. caucasicum* характеризовались наибольшими концентрациями азота — 4.94 и 4.59% соответственно.

В возрасте 4 мес. концентрация азота в надземной части всех видов растений уменьшилась, и она стала хорошо соответствовать растениям, произрастающим в естественных условиях. Минимальным значением по-прежнему характеризовался *T. polyphyllum* (1.92%), а у других видов концентрация N составила 2.10–3.48%. В корнях

концентрация азота изменилась в меньшей степени — значительно уменьшилась только у *T. polyphyllum* (до 2.23%) и *A. vulneraria* (до 2.33%). У трех других видов она осталась на прежнем уровне, а в корнях *H. caucasicum* также по-прежнему была наименьшей (1.81%).

Изотопный состав азота в надземных и подземных органах всех видов бобовых (за исключением корней *A. vulneraria* в возрасте 2.5 мес. значение не различался и был близок к изотопному составу азота атмосферы: величины δ<sup>15</sup>N находились в пределах от -0.52 до 0.37‰. У *T. polyphyllum* величина δ<sup>15</sup>N оказалась максимально приближенной к атмосферному значению (-0.08‰ для надземной части и 0.03 ‰ для корней). В корнях *A. vulneraria* величина δ<sup>15</sup>N составила 4.95‰.

С возрастом растений в изотопном составе азота произошли некоторые изменения. В целом они характеризовались тенденцией к уменьшению величины δ<sup>15</sup>N (примерно на 1‰), но статистически значимое снижение отмечено только для *O. kubanensis*, корней *A. vulneraria* и надземной части *T. polyphyllum*. В корнях *A. vulneraria* по-прежнему была выраженная положительная величина δ<sup>15</sup>N (3.21‰). В сравнении с другими частями растений клубеньки заметно обогащены тяжелым изотопом азота (величина δ<sup>15</sup>N составила 8.45‰ у *A. vulneraria* и 4.70‰ у *H. caucasicum*). Ранее было показано, что азот клубеньков часто,

хотя и не всегда, обогащен изотопом  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$  может превышать 10‰), и его накопление в клубеньках ассоциировано с бактериальными клетками [5]. Такая аккумуляция соответствует общей закономерности обогащения азота микроорганизмов тяжелым изотопом  $^{15}\text{N}$ , показанной на примере общей микробной биомассы почв [21–23], мицелия и плодовых тел эктомикоризных грибов [24, 25].

Механизм, ответственный за аккумуляцию  $^{15}\text{N}$  в микробных клетках, заключается в повышенной дискриминации тяжелого изотопа в процессе диссимиляции азота микроорганизмами в сравнении с его ассимиляцией. Эффективность такого механизма определяется соотношением доступности углерода и азота при питании микроорганизмов, которое контролирует активность процесса диссимиляции азота [22, 23]. При симбиотической азотфиксации, подобно микоризному симбиозу, микробная диссимиляция азота проявляется в преимущественной передаче изотопа  $^{14}\text{N}$  растению-хозяину и аккумуляции  $^{15}\text{N}$  в биомассе микроорганизмов. В этом случае фракционирование изотопов между симбионтами снижается при уменьшении эффективности симбиоза, что подтверждается на примерах как микоризного [24, 26], так и азотфиксирующего [5] симбиозов.

#### Эффективность симбиотической азотфиксации

Отклонения величины  $\delta^{15}\text{N}$  бобовых растений от 0‰ рассматриваются как следствие вклада в азотное питание почвенных источников, отличающихся по изотопному составу от атмосферного азота. Наличие таких различий позволяет рассчитать долю азота, получаемого растением в результате азотфиксации (биологический азот) [5].

Однако результаты определения изотопного состава азота в растениях 2.5-месячного возраста не позволили нам рассчитать вклад биологического азота в азотный пул молодых бобовых растений. Причиной послужило то, что контрольный вид (*T. polyphyllum*), не образующий симбиоз с азотфиксирующими бактериями, характеризовался значениями  $\delta^{15}\text{N}$ , наиболее близкими к изотопному составу азота атмосферы как в надземной (–0.08‰), так и в подземной (0.03‰) частях растения.

Для растений 4-месячного возраста изотопные данные уже дают такую возможность. При использовании для расчета показателей изотопного состава азота в надземной части растения вклад фиксированного из атмосферы азота в питание составил 55% для *A. levieri*, 34% – для *O. kubanensis* и 15% – для *H. caucasicum* (см. табл. 2). В полевых условиях для двух первых видов при использовании для расчета величины  $\delta^{15}\text{N}$  надземной части растений ранее были получены более высокие

показатели (около 70% – по результатам определения естественной концентрации  $^{15}\text{N}$  и свыше 90% – в эксперименте с разбавлением изотопной метки [12]).

Исключение представляет *A. vulneraria*, для которого величина  $\delta^{15}\text{N}$  в надземной части растения такая же (–1.19‰), как и у *T. polyphyllum*, что не позволяет оценить вклад азотфиксации в его питание. В полевых условиях для *A. vulneraria* была показана заметно меньшая роль азотфиксации в обеспечении растения азотом, несмотря на активное формирование клубеньков [12].

В отличие от надземной части изотопный состав азота в корнях не позволяет рассчитать вклад азотфиксации в азотное питание многолетних бобовых растений альпийского пояса в первый год их роста, так как корни *T. polyphyllum* характеризовались наиболее близким к атмосферному значению  $\delta^{15}\text{N}$  не только в возрасте 2.5 мес., но и в 4 мес.

Оценка вклада азотфиксации в азотное питание растений оказалась неожиданной. Она свидетельствует о том, что виды, наиболее активно формирующие клубеньки (*A. vulneraria* и *H. caucasicum*), в меньшей степени используют биологический азот для своего питания. Такой факт не может не вызвать вопроса, тем более что клубеньки *A. vulneraria* и *H. caucasicum* заметно обогащены изотопом  $^{15}\text{N}$ , и известна прямая связь между такой обогащенностью и эффективностью азотфиксации [5].

Ранее [12], обсуждая относительно небольшое участие атмосферного азота в питании *A. vulneraria*, мы обращали внимание на принципиально меньшую глубину корневой системы у этого растения, что могло повлиять на результат проведенной оценки. Поскольку в условиях вегетационного эксперимента этот фактор нивелируется, то мы рассматриваем другую причину, которая может привести к снижению оценки участия азотфиксации в азотном питании растений, активно формирующих клубеньки, – фракционирование изотопов между симбионтами.

Обычно считается, что поскольку на долю клубеньков приходится менее 10% от общего азота в растении (3 и 6% для *A. vulneraria* и *H. caucasicum*), то их обогащение изотопом  $^{15}\text{N}$  не приводит к заметному обеднению тяжелым изотопом пула элемента в растении. Величина  $\delta^{15}\text{N}$  бобового растения оказывается приближенной к атмосферному азоту [27, 28], и эффект фракционирования можно не учитывать при расчете вклада азотфиксации в его питание [5].

Однако совершенно очевидно, что при накоплении тяжелого изотопа азота в клубеньках небольшие отрицательные значения  $\delta^{15}\text{N}$  в других частях бобовых растений связаны с фракциони-

рованием изотопов между клубеньковыми бактериями и растением-хозяином. Если, например, принять пул азота бактерий за 5% от общего количества азота в растении, а величину  $\delta^{15}\text{N}$  этого пула за 6.0‰, то при фракционировании изотопов обеспечивается снижение величины  $\delta^{15}\text{N}$  растения на 0.3‰ относительно азота атмосферы. При большом различии величин  $\delta^{15}\text{N}$  между бобовым и контрольным видами (3–5‰) такой эффект действительно не окажет существенного влияния на расчетный показатель. Однако при небольшом различии (1–2‰), часто наблюдаемом для растений в альпийских и субальпийских экосистемах [7, 10, 12], игнорирование фракционирования может привести к заметной (10–20%) недооценке вклада азотфиксации в питание бобовых. Очевидно, что в таких случаях следует принимать во внимание поправку на фракционирование изотопов между симбионтами.

Кроме того, *A. vulneraria* представляет особый случай, когда не только клубеньки, но и корни в целом характеризуются тяжелым изотопным составом азота. Обычно более тяжелый изотопный состав азота в корнях связывают с фракционированием изотопов между микоризными грибами (часть мицелия которых находится в корнях) и растением-хозяином [26, 28]. Конкретная причина аккумуляции  $^{15}\text{N}$  в корнях *A. vulneraria* не известна, но совершенно очевидно, что фракционирование изотопов между частями этого растения приводит к формированию наиболее легкого (среди всех изученных нами азотфиксирующих видов бобовых) изотопного состава азота в его надземной части. При расчете эффективности азотфиксации по величине  $\delta^{15}\text{N}$  в надземной части растения фактор фракционирования изотопов не позволяет идентифицировать ее наличие у *A. vulneraria* в условиях вегетационного эксперимента и, очевидно, дает заниженный показатель при анализе растения в полевых условиях [12]. На долю «тяжелых» корней у *A. vulneraria* приходится 16% общего пула азота, что дает уменьшение  $\delta^{15}\text{N}$  в надземной части растения на 0.5‰.

Для наиболее точного расчета доли симбиотической азотфиксации в питании бобовых растений следует использовать средневзвешенное для всего растения значение  $\delta^{15}\text{N}$ . Это легко осуществить в условиях вегетационного эксперимента, сложнее — при анализе сельскохозяйственных культур и гораздо более проблематично — при изучении естественных экосистем. Проведенные нами расчеты по средневзвешенному показателю  $\delta^{15}\text{N}$  внесли существенную корректировку в значение  $N_{\text{биол}}$ , увеличив его с 0 до 51% для *A. vulneraria* и с 15 до 32% для *H. caucasicum* (см. табл. 2). В обоих случаях увеличение показателя заслуживает доверия, поскольку связано с использованием в расчете статистически значимо больших значе-

ний  $\delta^{15}\text{N}$  в корнях (*A. vulneraria*) и клубеньках (*A. vulneraria* и *H. caucasicum*) растений. Уменьшение  $N_{\text{биол}}$  для двух других видов бобовых не столь очевидно, поскольку определяется меньшими (но статистически незначимо) значениями  $\delta^{15}\text{N}$  в корнях и отсутствием данных по клубенькам.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многолетние бобовые растения альпийского пояса Северо-Западного Кавказа обладают симбиотической азотфиксацией, которая проявляется в первый год их развития. Фракционирование изотопов между симбионтами может приводить к формированию «легкого» изотопного состава азота в надземной части растения и стать причиной получения заниженных показателей при расчете доли симбиотически фиксированного азота. Для наиболее корректной ее оценки по изотопным данным следует ориентироваться на средневзвешенное для всего растения (включая клубеньки) значение  $\delta^{15}\text{N}$ . Поскольку в полевых условиях (особенно в естественных экосистемах) это представляет существенную методическую проблему, то для расчета вклада симбиотической азотфиксации в азотное питание растения следует определять изотопный состав азота в листьях, корнях и клубеньках и при необходимости (в случае наличия существенных пулов азота с большой разницей изотопного состава) вводить поправки на фракционирование изотопов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 16-14-10208).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cleveland C.C., Townsend A.R., Schimel D.S. et al. Global patterns of terrestrial biological nitrogen ( $\text{N}_2$ ) fixation in natural ecosystems // *Glob. Biogeochem. Cycle*. 1999. V. 13. P. 623–645.
2. Galloway J.N., Dentener F.J., Capone D.G. et al. Nitrogen cycles: past, present, and future // *Biogeochemistry*. 2004. V. 70. P. 153–226.
3. Vitousek P.M., Menge D.N.L., Reed S.C., Cleveland C.C. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems // *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2013. V. 368. Art. 20130119.
4. Wang J., He Q., Wu Y. et al. Effects of pioneer  $\text{N}_2$ -fixing plants on the resource status and establishment of neighboring non- $\text{N}_2$ -fixing plants in a newly formed glacier floodplain, eastern Tibetan Plateau // *Plant Soil*. 2020.
5. Shearer G., Kohl D.H.  $\text{N}_2$ -fixation in field settings: Estimation based on natural  $^{15}\text{N}$  abundance // *Aust. J. Plant Physiol.* 1986. V. 13. P. 699–756.
6. Andrews M., James E.K., Sprent J.I. et al. Nitrogen fixation in legumes and actinorhizal plants in natural ecosystems: values obtained using  $^{15}\text{N}$  natural abundance // *Plant Ecology Diversity*. 2011. V. 4. P. 131–140.



7. *Bowman W.D., Schardt J.C., Schmidt S.K.* Symbiotic N<sub>2</sub>-fixation in alpine tundra: ecosystem input and variation in fixation rates among communities // *Oecologia*. 1996. V. 108. P. 345–350.
8. *Arnone III J.A.* Symbiotic N<sub>2</sub> fixation in a high Alpine grassland: effects of four growing seasons of elevated CO<sub>2</sub> // *Functional Ecology*. 1999. V. 13. P. 383–387.
9. *Holzmann H.-P., Haselwandter K.* Contribution of nitrogen fixation to nitrogen nutrition in an alpine sedge community (*Caricetum curruale*) // *Oecologia*. 1988. V. 76. P. 298–302.
10. *Jacot K.A., Lüscher A., Nösberger J., Hartwig U.A.* Symbiotic N<sub>2</sub> fixation of various legume species along an altitudinal gradient in the Swiss Alps // *Soil Biol. Biochem.* 2000. V. 32. P. 1043–1052.
11. *Макаров М.И., Малышева Т.И., Ермак А.А. и др.* Симбиотическая азотфиксация в сообществе альпийской лишайниковой пустоши Северо-Западного Кавказа (Тебердинский заповедник) // *Почвоведение*. 2011. № 12. С. 1504–1512.
12. *Makarov M.I., Onipchenko V.G., Malysheva T.I. et al.* Determinants of <sup>15</sup>N natural abundance in leaves of co-occurring plant species and types within an alpine lichen heath in the Northern Caucasus // *Arctic, Antarctic, Alpine Research*. 2014. V. 46. P. 581–590.
13. *Jacot K.A., Lüscher A., Nösberger J., Hartwig U.A.* The relative contribution of symbiotic N<sub>2</sub> fixation and other nitrogen sources to grassland ecosystems along an altitudinal gradient in the Alps // *Plant Soil*. 2000. V. 225. P. 201–211.
14. *Soudzilovskaia N.A., Aksenova A.A., Makarov M.I. et al.* Legumes affect alpine tundra community composition via multiple biotic interactions // *Ecosphere*. 2012. V. 3. Article Number UNSP 33.
15. *Gentili F.G., Huss-Danell K.* The δ<sup>15</sup>N value of N<sub>2</sub> fixing actinorhizal plants and legumes grown with N<sub>2</sub> as the only nitrogen source // *Symbiosis*. 2019. V. 79. P. 213–219.
16. *Гришина Л.А., Онипченко В.Г., Макаров М.И., Ванясин В.А.* Изменения свойств горно-луговых альпийских почв Северо-Западного Кавказа в различных экологических условиях // *Почвоведение*. 1993. № 4. С. 5–12.
17. *Макаров М.И., Лавренов Н.Г., Онипченко В.Г. и др.* Азотное питание растений альпийской лишайниковой пустоши в условиях обогащения почвы элементами минерального питания // *Экология*. 2020. № 2. С. 83–89. [*Makarov M.I., Lavrenov N.G., Onipchenko V.G. et al.* Nitrogen nutrition of plants in an alpine lichen heath under the conditions of soil enrichment with biogenic elements // *Rus. J. of Ecology*. 2020. V. 51. № 2. P. 99–106.]
18. *Sprent J.I.* Biological nitrogen fixation associated with angiosperms in terrestrial ecosystems // *Nutrient acquisition by plants. Ecological Studies (Analysis and synthesis)*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2005. V. 181. P. 89–115.
19. *Gigon A.* Positive interaktionen in einem alpinen Blumenpolster // *Ber. d. Reinh.-Tüxen-Ges.* 1999. V. 11. P. 321–330.
20. *Thomas B.D., Bowman W.D.* Influence of N<sub>2</sub>-fixing *Trifolium* on plant species composition and biomass production in alpine tundra // *Oecologia*. 1998. V. 115. P. 26–31.
21. *Dijkstra P., Ishizu A., Doucett R.R. et al.* <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N natural abundance of the soil microbial biomass // *Soil Biol. Biochem.* 2006. V. 38. P. 3257–3266.
22. *Dijkstra P., LaViolette C.M., Coyle S.C. et al.* <sup>15</sup>N enrichment as an integrator of the effects of C and N cycling on microbial metabolism and ecosystem function // *Plant Soil*. 2008. V. 115. P. 189–198.
23. *Coyle J.S., Dijkstra P., Doucett R.R. et al.* Relationships between C and N availability, substrate age, and natural abundance <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N signatures of soil microbial biomass in a semiarid climate // *Soil Biol. Biochem.* 2009. V. 41. P. 1605–1611.
24. *Hobbie E.A., Jumpponen A., Trappe J.* Foliar and fungal <sup>15</sup>N : <sup>14</sup>N ratios reflect development of mycorrhizae and nitrogen supply during primary succession: testing analytical models // *Oecologia*. 2005. V. 146. P. 258–268.
25. *Hobbie E.A., Hobbie J.E.* Natural abundance of <sup>15</sup>N in nitrogen-limited forests and tundra can estimate nitrogen cycling through mycorrhizal fungi: a review // *Ecosystems*. 2008. V. 11. P. 815–830.
26. *Макаров М.И., Бузин И.С., Тиунов А.В. и др.* Изотопный состав азота в почвах и растениях горно-тундровых экосистем Хибин // *Почвоведение*. 2019. № 10. С. 1185–1197.
27. *Handley L.L.* Diazotrophy and δ<sup>15</sup>N biology and environment // *Proc. Royal Ir. Acad.* 2002. V. 102. P. 49–51.
28. *Hobbie E.A., Macko S.A., Williams M.* Correlations between foliar δ<sup>15</sup>N and nitrogen concentrations may indicate plant-mycorrhizal interactions // *Oecologia*. 2000. V. 122. P. 273–283.