

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Горепекин Иван Владимирович

**АЛЛЕЛОТОКСИЧНОСТЬ ПОЧВ И ЕЁ ВЛИЯНИЕ НА
ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР**

Специальность 1.5.15 – Экология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва, 2023

Работа выполнена на кафедре Географии почв факультета почвоведения ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Научный руководитель *Федотов Геннадий Николаевич*, доктор биологических наук, доцент/с.н.с.

Официальные оппоненты *Воронина Людмила Петровна*, доктор биологических наук, доцент/с.н.с., ведущий научный сотрудник кафедры агрохимии и биохимии растений факультета почвоведения, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ларикова Юлия Сергеевна, кандидат биологических наук, доцент/с.н.с., доцент кафедры физиологии растений института агробиотехнологии ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева»

Лобков Василий Тихонович, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, профессор кафедры земледелия, агрохимии и агропочвоведения факультета агробизнеса и экологии ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина»

Защита диссертации состоится «14» ноября 2023 года в 17 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.3 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова на факультете почвоведения по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, аудитория М-2.

Тел: 8(495)–939-24-67, E-mail: paramonovata@my.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и также в электронном виде на и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.3/2615>:

Автореферат разослан «28» сентября 2023 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Парамонова Т.А.

Актуальность проблемы

Почвоутомление представляет собой явление значительного снижения почвенного плодородия при выращивании сельскохозяйственных культур. В отечественной литературе этот термин закрепился во многом благодаря работам А.М. Гродзинского (Гродзинский и др., 1979, 1991), который ведущую роль в данном процессе отводил накоплению в почвах аллелопатических соединений – биологически активных веществ, посредством которых взаимодействуют организмы. В англоязычной литературе они также известны как «allelochemicals» (Kong et al., 2019; Reigosa et al., 2006; Scavo et al., 2019; Tomilov et al., 2006; Weir et al., 2004).

Позднее было показано (Reigosa et al., 2006), что любая стрессовая реакция растений способствует выделению аллелотоксинов – биологически активных веществ, ингибирующих развитие растений и микроорганизмов. Эти соединения могут закрепляться в почве благодаря её высокой сорбционной способности (Kobayashi, 2004; Scavo et al., 2019), в результате чего почва начинает оказывать длительное ингибирующее влияние на развитие обитающих в ней организмов. Это явление носит название аллелотоксичности почв.

Разнообразие биохимических механизмов негативного влияния аллелотоксинов и повсеместное распространение аллелопатических взаимоотношений в агроценозах приводят к значительным потерям урожайности сельскохозяйственных культур. По данным ФАО (Жученко, 2009; Защепкин, 2016), почвоутомлению подвержены около 1250 млн. га сельскохозяйственных угодий, а потери мирового урожая при этом достигают 25% от ожидаемых величин.

Наиболее общим мероприятием по борьбе с почвоутомлением остаются севообороты (Лобков, 2017), которые были подобраны опытным путём и позволяют снижать аллелотоксичность, однако методы прямого контроля её величины, массово используемые в производстве, в настоящее время отсутствуют.

Из литературы известно (Коношина, 2015; Cheema et al., 2013; Cheng H., 1992; Reigosa et al., 2006), что аллелотоксичность сильнее всего проявляется на этапе прорастания семян. Для улучшения прорастания часто используют препараты-стимуляторы для предпосевной обработки семян. Однако их действие в полевых условиях также должно проявляться на фоне действия лимитирующего фактора – почвенных аллелотоксинов.

Целью работы является оценка влияния аллелотоксичности почв на прорастание семян и определение механизмов повышения эффективности действия стимуляторов для предпосевной обработки зерновых культур.

Задачи работы:

1. Изучение влияния аллелотоксичности зональных типов почв Русской равнины (дерново-подзолистой, серой лесной, чернозема, каштановой) на прорастание семян зерновых культур.
2. Оценка развития семян при снижении влияния аллелотоксинов на их прорастание.
3. Оценка эффективности стимуляторов прорастания семян в лабораторных и полевых условиях, когда ограничивается поступление аллелотоксинов в семена, но при этом сохраняется поток стимулирующих биологически активных веществ из почв.

Объектом исследования являются семена зерновых культур (ячменя, озимой ржи, яровой пшеницы, озимого тритикале) различных сортов, а **предметом исследования** – аллелотоксичность почв зонального ряда Русской равнины (дерново-подзолистая, серая лесная, чернозем, каштановая) с различной историей землепользования.

Научная новизна

1. Показано, что действие стимуляторов прорастания семян реализуется на фоне негативного влияния на растения почвенных аллелотоксинов. Это объясняет низкую эффективность препаратов при переходе от лабораторных к полевым условиям.

2. Установлен механизм биологической активности сорбционных препаратов для предпосевной обработки семян на почвах с выраженной аллелотоксичностью. Он заключается в переводе аллелотоксинов в недоступное для растений состояние.
3. Предложен подход для повышения эффективности применения сорбентов для предпосевной обработки семян. Он заключается в добавлении к сорбентам автолизата пивных дрожжей (АПД). Сорбент, находящийся на поверхности обработанных семян, без использования АПД закрепляет почвенные аллелотоксины и стимулирующие биологически активные вещества из почв. При добавлении АПД сорбент закрепляет только аллелотоксины, а стимулирующие биологически активные вещества продолжают поступать из почв в семена.

Практическая значимость

1. Разработан метод биотестирования для оценки почвенной аллелотоксичности, защищенный патентом РФ № 2704100. Он может быть использован для контроля аллелотоксичности почв и подборе сортов зерновых, наиболее устойчивых к комплексу аллелотоксинов конкретной почвы.
2. Предложено 14 сорбционно-стимулирующих препаратов для предпосевной обработки семян зерновых культур, защищенных патентами Российской Федерации, механизм действия которых основан на ограничении поступления аллелотоксинов в растения.

Методология и методы исследования

Для изучения влияния аллелотоксичности почв на развитие семян использован метод биотестирования, основанный на измерении суммарной длины проростков семян. В работе также использовали традиционные методы проведения химического анализа почв, растровую электронную микроскопию (для оценки покрытия семян сорбционными составами). Для проверки потребления микроорганизмами почвенных аллелотоксинов использовали методы культивирования актиномицетов, выделенных из различных сред.

Положения, выносимые на защиту

1. Аллелотоксичность проявляется в почвах, отличающихся по типу и истории землепользования, и снижает скорость прорастания семян. При этом величина замедления почвами развития семян зависит от сорта и культуры. Сорт, проявляющий наибольшую устойчивость к комплексу аллелотоксинов одной почвы, сохраняет это свойство при посеве на другой почве.
2. Эффективность стимуляции прорастания семян в полевых условиях зависит от наличия в почвах аллелотоксинов, которые замедляют развитие семян.
3. Эффективность существующих стимуляторов прорастания семян улучшается при их совместном использовании с бентонито-гуматовой смесью, сорбирующей аллелотоксины, и автолизатом пивных дрожжей, который занимает активные центры глино-гумусового комплекса, на которых могут закрепляться стимулирующие вещества, поступающие из почв в семена.

Личный вклад автора

Автором был спланирован и проведен комплекс экспериментов по оценке влияния почвенной аллелотоксичности на развитие растений. Мелкоделяночный опыт по проверке влияния разработанного состава на повышение полевой всхожести семян был проведен автором в Орловской области. Испытания разработанного препарата для снижения аллелотоксичности в теплицах были проведены автором на базе РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Автором были собраны и обработаны полученные экспериментальные результаты, а также подготовлены публикации (индивидуальные и в соавторстве). В работе [1], написанной в соавторстве, вклад автора составил 0,21 п.л. из 0,64 п.л., в работе [2] - 0,27 п.л. из 0,80 п.л., в работе [3] – 0,3 п.л. из 0,76 п.л., в работе [4] - 0,58 п.л. из 0,89 п.л., в работе [5] – 0,35 п.л. из 1,04 п.л., в работе [6] – 0,15 п.л. из 0,45 п.л., в работе [7] – 0,52

п.л. из 0,69 п.л., в работе [8] – 0,14 п.л. из 0,42 п.л., в работе [9] – 0,16 п.л. из 0,48 п.л., в работе [10] – 0,35 п.л. из 1,06 п.л., в работе [11] – 0,7 п.л. из 1,18 п.л.

Публикации

Основные положения и выводы диссертационного исследования изложены в 31 научной работе (из них - 18 патентов).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав, выводов, списка литературы и приложений. Материалы работы изложены на 153 страницах, содержат 23 таблицы, 26 рисунков. Список литературы включает 198 источников, в том числе 87 на иностранном языке.

Благодарности

Автор работы глубоко признателен руководителю, д.б.н., ведущему научному сотруднику Г.Н. Федотову за помощь, рекомендации и поддержку на различных этапах работы. За ценные предложения и замечания, высказанные к работе, автор выражает благодарность члену-корреспонденту РАН Шобе С.А, д.б.н. Ковалевой Н.О., д.б.н. Е.Б. Пашкевич, д.б.н. Е.В. Шеину, д.б.н. А.В. Смагину, а также сотрудникам кафедры географии почв. Автор благодарен д.б.н. Л.В. Лысак и к.б.н. Т.А. Грачевой за предоставленную возможность и помощь в организации проведения микробиологического анализа почв. Автор выражает благодарность к.б.н. Т.М. Джанчарову и Г.Э. Тер-Петросянцу за предоставленную возможность и консультационную поддержку при проведении вегетационных опытов на базе РГАУ МСХА имени К.А. Тимирязева, а также Потапову Д.И. за помощь в организации полевых испытаний в Орловской области. Работа выполнена в рамках темы государственного задания №122011800459-3 «Почвенные биомаркеры: идентификация, устойчивость, активность, возможность использования для мониторинга».

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов была подтверждена публикациями в высокорейтинговых изданиях, индексируемых в системах

Web of Science, Scopus, а также в изданиях, входящих в перечень ВАК. Результаты работы были также апробированы в ходе выступления на конференциях «Ломоносовские чтения» (2018, 2019, 2021, 2023, Москва, Россия), «Докучаевские чтения» (2019, Санкт-Петербург), «Фундаментальные концепции физики почв: развитие, современные приложения и перспективы» (2019, Москва, Россия), «Вильямсовские чтения» (2018, 2022, Москва, Россия), «Почвоведение: Горизонты будущего» (2022, Москва, Россия).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. Обзор литературы

Аллелотоксичность почв неразрывно связана с аллелопатическим почвоутомлением (Gawęda et al., 2020; Li et al., 2019; Li et al., 2014; Sugiyama, 2019; Xianwen and Huachun, 2020; Zhou and Fu, 2015), которое является значимым фактором, ограничивающим получение высоких урожаев сельскохозяйственных культур (Жученко, 2009; Защепкин, 2016).

Эффект от действия почвенной аллелотоксичности на растения определяется степенью закрепления веществ-ингибиторов (Гродзинский и др., 1979; Blum et al., 1991; Cheng, 1992; Reigosa et al., 2006; Vinken and Schäffer, 2005), их совместным действием на организм (Einhellig, 1996; Latif et al., 2017; Tharayil et al., 2008), а также чувствительностью самого растения к аллелотоксинам (Гродзинский и др., 1979; Млечко и Мотренко, 2015; Kobayashi, 2004; Vuуuan, 2002). Поэтому на данный момент единственным количественным методом выражения эффекта аллелотоксичности может являться биотестирование.

До настоящего момента высокопроизводительный метод биотестирования, позволяющий работать на наиболее уязвимой стадии развития растений – прорастания семян, отсутствовал, что ограничивало исследования по изучению почвенной аллелотоксичности.

Почвенные аллелотоксины имеют различные механизмы действия на растения (Cheng and Cheng, 2015; Weir et al., 2004), однако все они определяются их действующей концентрацией. Следовательно, снижение

активности этих веществ позволит улучшать развитие произрастающих на почвах растений. Создание на границе почва-зерновка защитного слоя за счёт известного в сельском хозяйстве агроприема – предпосевной обработки семян – может позволить решить данную задачу.

При этом действие существующих препаратов-стимуляторов для предпосевной обработки семян также реализуется на фоне негативного влияния почвенной аллелотоксичности. Поэтому снижение негативного влияния аллелотоксинов на прорастание семян может выступить перспективным способом повышения эффективности известных стимуляторов для предпосевной обработки.

ГЛАВА 2. Объекты и методы исследования

2.1. Объекты исследования

Исследования проводили на семенах яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сортов Лиза, Злата, Эстер, Агата, Любава и РИМА, Гранни, озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) Московская-56, Московская-17, ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорт Нур, Златояр, Эльф, Яромир, Московский-86, Владимир, озимой ржи (*Secale cereale* L.) сорт Татьяна, Московская 12 и Московская 15, а также тритикале (*Тритикале X Triticosecale* Wittm. ex A. Camus) сорт Немчиновский 56.

Основные исследования в работе были проведены на сортах яровой пшеницы. Другие культуры использовали при исследовании связи между химическими свойствами почв и аллелотоксичностью, а также при проверке эффективности итогового препарата-стимулятора, который показал лучший результат на яровой пшенице.

В работе использовали 13 образцов почв, принадлежащих к различным типам и отличающихся историей землепользования (поля под севооборотами, лесом или залежные участки). Среди них были 9 дерново-подзолистых почв, серая лесная, чернозем типичный и чернозем выщелоченный и каштановая почва. Для оценки аллелотоксичности в качестве субстрата сравнения,

который не содержит аллелотоксинов, использовали отмытый речной песок с частицами 0,5–0,8 мм.

Для защиты семян от поступления в них почвенных аллелотоксинов использовали гумат калия (Г), бентонит кальция (БК).

В качестве биологически активных веществ к сорбционному препарату добавляли: автолизат пивных дрожжей (АПД), субстраты дыхательного метаболизма, гормоны роста растений и стимуляторы широкого спектра действия – парааминобензойную кислоту (ПАБК) и диэтиламиноэтил гексаноат – в обнаруженных оптимальных концентрациях.

Также было изучено влияние добавления в состав препарата неионогенных поверхностно-активных веществ (ПАВ): Полисорбата 20, Полисорбата 60 и Полисорбата 80, а также полиэтиленгликоля (ПЭГ).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Методика по оценке аллелотоксичности почв

Оценку аллелотоксичности почв проводили относительно песка путём биотестирования (Гродзинский и др., 1979). Для повышения достоверности результатов соблюдали условия:

- выборка семян для минимизации разнокачественности должна быть не менее 1000-1200 штук;
- для зерновых культур измеряемым показателем должна выступать суммарная длина проростков;
- проращивание должно проводиться в водно-воздушных условиях, при которых скорость развития семян в данном субстрате максимальна, так как в этом случае основное влияние на развитие семян будут оказывать биологически активные вещества (Обручева, Антипова, 1997).

Обнаруженная нами линейная зависимость между насыпным объемом проросших семян в воде и длиной их проростков (Рисунок 1, 2) позволила сократить время проведения опытов в 25 раз по сравнению с измерением проростков семян вручную.

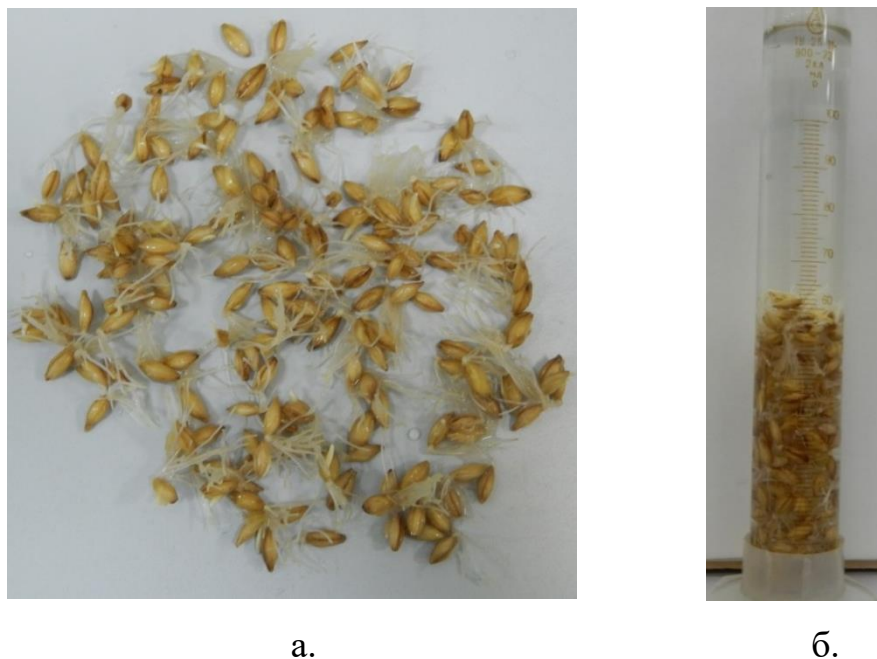


Рис. 1. Проросшие семена ярового ячменя сорт Нур (исходный вес 7,5 г) россыпью (а) и в цилиндре с водой после вибрационного уплотнения (б).

Проведенная проверка на различных культурах показала существование указанной зависимости для яровой пшеницы, ярового ячменя, озимой пшеницы, озимой ржи (см. Рисунок 2).

При оценке аллелотоксичности почв на дно сосуда диаметром 95 мм помещали 30 г почвы или песка, затем ровным слоем размещали 7,5 г семян, а сверху – 30 г почвы или песка. Затем мерной пипеткой в сосуд добавляли воду и помещали его на термостатирование в камеру (25°C и влажность близкая к 100%). Период термостатирования зависел от культуры/сорта.

Проросшие семена перемещали на сито и отмывали от субстрата. После этого их помещали порциями в мерный цилиндр с водой (объем цилиндра 100 мл), который размещали на вибростоле (частота колебаний 50 Гц). Каждая порция семян создавала в цилиндре ажурную и пористую структуру из проростков, которую дополнительно уплотняли грузиком массой 8 г в течение 15-20 секунд. После размещения всех семян в цилиндре на них вновь помещали грузик и дополнительно уплотняли постукиванием (40 раз) цилиндра о стол. Это создавало однородную структуру, а нижняя граница

груза повышала точность определения насыпного объема до 0,5 мл. Отношение насыпного объема семян, проросших в почвах относительно объема семян на песке, выраженное на песке, позволяло оценивать аллелотоксичность почв.

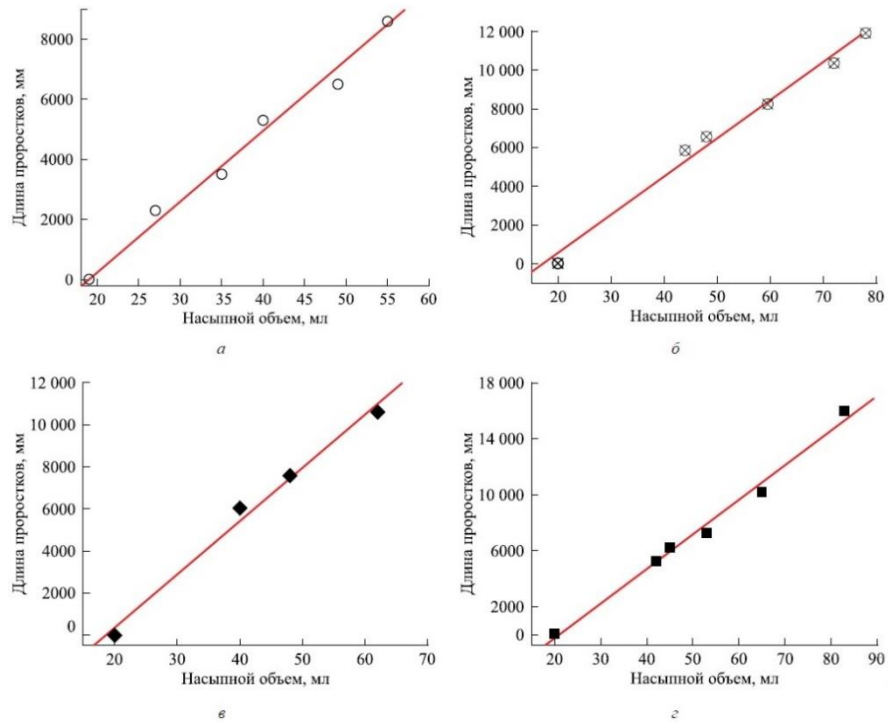


Рис. 2. Зависимость насыпного объема 7,5 г проросших семян от длины проростков (корней и ростков) озимого тритикале сорт Немчиновский 56 (а), яровой пшеницы сорт Лиза (б), озимой ржи сорт Татьяна (в) и ярового ячменя сорт Нур (г).

В одной повторности использовали навеску семян массой 7,5 грамм. Опыты проводили в шестикратной повторности. Это позволяло использовать в опыте 1000-1200 семян, что снижало ошибку, связанную с разнокачественностью семян. Статистическую обработку результатов проводили в программном обеспечении OriginPro, в котором рассчитывали доверительный интервал, который не превышал 15% при 95% доверительной вероятности.

2.2.2. Методика по оценке эффективности действия стимуляторов для предпосевной обработки семян

Для оценки эффективности действия стимуляторов использовали метод биотестирования, описанный в пункте 2.2.1., позволяющий определять среднюю скорость развития проростков массива семян. В качестве контроля использовали семена, не обработанные стимуляторами.

2.2.3. Определение химических свойств почв

Для изученных в работе почв определяли (Воробьева, 2006; Минеев, 1989): pH_{KCl} , содержание подвижного фосфора, калия, обменного кальция. Общее содержание углерода, азота и серы определяли на CHNS-анализаторе Vario EL III, Elementar, Germany. Данные по основным типам почв представлены в таблице 1.

Таблица 1. Химические свойства некоторых образцов почв, исследованных в работе (в скобках указаны их номера в главе «Объекты и методы исследования»)

| Почвы | Предшествующая культура | Ca, (обмен.) мг/100г | pH (KCl) | N, % | P ₂ O ₅ , мг/100г | K ₂ O, мг/100г | S, % | C, % |
|-------------------------|-------------------------|----------------------|----------|------|---|---------------------------|------|------|
| Дерново-подзолистая (9) | Пшеница | 133 | 5,3 | 0,14 | 29 | 19,4 | 0,05 | 1,65 |
| Серая лесная (11) | Пшеница | 100 | 5 | 0,12 | 18,5 | 15,5 | 0,05 | 1,07 |
| Чернозём (10) | Картофель | 316 | 5,3 | 0,24 | 4 | - | 0,08 | 3,58 |
| Каштановая (12) | Залежь | 150 | 6,2 | 0,09 | 5,5 | 11 | 0,05 | 0,8 |

2.2.4. Методика изучения поверхности семян при помощи растрового электронного микроскопа

Распределение частиц бентонита на поверхности зерновок, обработанных препаратом-стимулятором на основе бентонито-гуматовой смеси, изучали при помощи растрового электронного микроскопа JEOL-6060A (фирмы JEOL, Япония).

2.2.5. Методика обработки семян мицелиальными актинобактериями

В работе использовали чистые культуры мицелиальных актинобактерий рода *Streptomyces*, которые были выделены из различных местообитаний. Актинобактерии поддерживали на среде Гаузе I.

Семена пшеницы обрабатывали суспензией, содержащей 10^7 - 10^8 клеток в 1 мл. Дальнейшую оценку эффективности суспензии проводили в соответствии с методикой, описанной в пункте 2.2.1. В качестве контроля использовали семена, не обработанные суспензией.

2.2.6. Проверка эффективности разработанного препарата-стимулятора в мелкоделяночных опытах

Проверку эффективности разработанного препарата-стимулятора на яровой пшенице сорт Гранни проводили путем посева ручной сеялкой на деланки площадью 1 м^2 в количестве 19,6 кг (исходя из нормы высева 4,5 млн семян на гектар). Полевую всхожесть оценивали методом подсчёта побегов на 19 день с момента посева, а проективное покрытие оценивали в программе Fijj.

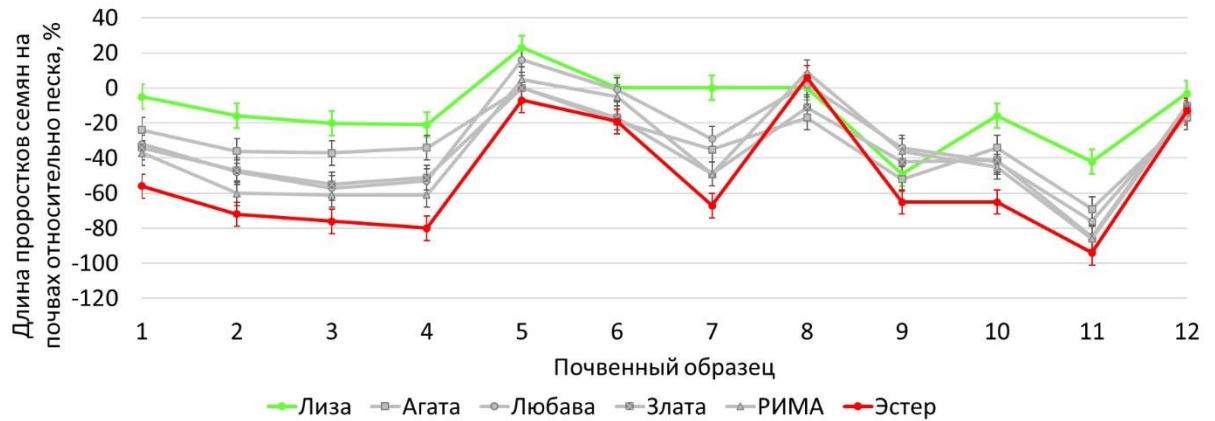
ГЛАВА 3. Результаты и их обсуждение

1. Влияние истории землепользования и химических свойств почв на их аллелотоксичность

Проращивание семян на почвах и оценка развития их проростков относительно песка позволили оценить аллелотоксичность исследуемых образцов почв (Рисунок 3).

На основе представленных данных можно сделать следующие выводы. Во-первых, аллелотоксичность изученных дерново-подзолистых почв во всех вариантах опыта с сортами яровой пшеницы снижает скорость развития семян зерновых культур даже в образцах залежных почв. Минимальное влияние аллелотоксичности отмечено на каштановой почве под залежью. Во-вторых, замедление развития семян почвами зависит от их сорта, т.е. сорт, проявляющий наибольшую устойчивость к комплексу аллелотоксинов одной почвы, будет сохранять это свойство относительно других сортов при переходе к другой почве. В-третьих, представленный способ оценки аллелотоксичности

почв может быть использован для улучшения существующих систем севооборотов, которые ориентированы на подбор культур, но не сортов, которые отличаются по своей восприимчивости к аллелотоксинам.



Предшествующая культура на участке:

- | | | |
|----------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 1. Викоовсяная смесь | 5. Разнотравно-злаковый луг | 9. Пшеница |
| 2. Горчица | 6. Разнотравно-злаковый луг | 10. Картофель |
| 3. Картофель | 7. Картофель | 11. Пшеница |
| 4. Ячмень | 8. Смешанный лес | 12. Типчаково-ковыльная степь |

Рис. 3. Аллелопатическое влияние почв на прорастание семян и развитие проростков различных сортов пшеницы, определяемое относительно развития семян в песке. Образцы 1-9 соответствуют дерново-подзолистым почвам различных видов землепользования, образец 10 – чернозему типичному, 11 – серой лесной почве, 12 – каштановой почве.

Отметим, что результаты, полученные для пшеницы, ячменя, ржи и тритикале, подтверждают наличие последовательности в ингибировании, обнаруженной для сортов яровой пшеницы.

В ходе дальнейшей работы было изучено влияние химических свойств почв на аллелотоксичность. Эти исследования проводили в два этапа: на первом изучили влияние отдельных химических свойств почв на аллелотоксичность, а на втором – их совместное влияние.

Из представленных в таблице данных можно сделать вывод (Таблица 2), что связь между аллелотоксичностью почв и отдельными химическими свойствами установлена для сортов яровой пшеницы Эстер и РИМА с P_2O_5 и

Любавы с K_2O . Корреляции между содержанием питательных элементов с аллелотоксичностью для других сортов обнаружено не было.

Таблица 2. Коэффициенты корреляции между ингибированием яровой пшеницы разных сортов и химическими свойствами почв*.

| Сорт | pH _{KCl} | Ca, мг/100 г | P ₂ O ₅ , мг/100 г | K ₂ O, мг/100 г | N, % | S, % | C, % |
|--------|-------------------|--------------|--|----------------------------|-------|-------|-------|
| Лиза | -0,323 | -0,190 | -0,430 | -0,395 | 0,184 | 0,164 | 0,193 |
| Агата | -0,164 | -0,096 | -0,394 | -0,306 | 0,226 | 0,223 | 0,244 |
| Любава | -0,326 | -0,335 | -0,564 | -0,592 | 0,264 | 0,286 | 0,339 |
| Злата | -0,166 | -0,130 | -0,514 | -0,425 | 0,261 | 0,288 | 0,315 |
| РИМА | -0,342 | -0,249 | -0,599 | -0,525 | 0,354 | 0,391 | 0,437 |
| Эстер | -0,423 | -0,271 | -0,651 | -0,555 | 0,409 | 0,449 | 0,493 |

Для проверки совместного влияния химических свойств на аллелотоксичность, определенную для яровой пшеницы, был проведен множественный регрессионный анализ. Уравнение множественной регрессии имеет следующий вид:

$$\hat{y} = -217,43 - 0,24X_1 + 41,21X_2 - 3,03X_3 + 105,04X_4, \quad (1)$$

где X_1 , X_2 , X_3 и X_4 – содержание Ca, pH, содержание P₂O₅ и N, соответственно.

В ходе анализа были сделаны следующие выводы:

1. Коэффициент детерминации для уравнения регрессии $R^2 = 0,81$. Его значимость подтверждается рассчитанным критерием Фишера (Значимость F) $0,011 < 0,05$.
2. В уравнение вошли только те химические свойства, для которых р-значения меньше 0,05, т.е. Ca, pH, P₂O₅, а также N.
3. В уравнение не вошли параметры содержания K₂O, S и C.

Коэффициенты в уравнении свидетельствуют о том, что при совместном влиянии химических свойств почв: 1) Ca: чем выше содержание кальция, тем ниже аллелотоксичность; 2) pH: чем выше значение pH, тем больше аллелотоксичность; 3) P₂O₅: чем выше содержание фосфора, тем ниже

аллелотоксичность; 4) N: чем выше содержание азота, тем больше аллелотоксичность. Эти свойства могут влиять на растения, создавая для него стрессовые условия, способствующие выделению аллелотоксинов и накоплению их в почве. При этом химические свойства могут также влиять на прочность связей, закрепляющих аллелотоксины в почвах.

2. Снижение негативного влияния аллелотоксинов при использовании микроорганизмов для обработки семян

В ряде работ приводятся сведения о том, что микроорганизмы способны использовать аллелотоксины в качестве источника углерода (Inderjit, 1996; Kong et al., 2019). С целью проверки данного предположения было изучено влияние обработки семян штаммами актиномицетов рода *Streptomyces* на прорастание семян пшеницы сорт Лиза в условиях почвенной аллелотоксичности.

Установлено (Таблица 3), что 4 из 18 проверенных штаммов (а 3, ер/28, ер/21, L/28) улучшали прорастание семян пшеницы.

Таблица 3. Влияние суспензии актиномицетов рода *Streptomyces* на прорастание семян пшеницы в дерново-подзолистой почве (9)* с аллелотоксичностью -27%

| № опыта | Номер штамма** | Эффект, % | Место выделения штамма |
|---------|----------------|-----------|----------------------------------|
| 1 | 5/15 | 0 | Сапрпель |
| 2 | а 1 | + 7 | Тропические почвы |
| 3 | а 2 | + 7 | Тропические почвы |
| 4 | 51 | - 9 | Почва, загрязнённая нефтью |
| 5 | 53 | - 5 | Почва, загрязнённая нефтью |
| 6 | KCl 12 | 0 | Кишечная жидкость |
| 7 | а 3 | + 9 | Тропические почвы |
| 8 | а 4 | - 1 | Тропические почвы |
| 9 | KCl 15 | - 5 | Кишечная жидкость |
| 10 | KCl 17 | + 1 | Кишечная жидкость |
| 11 | 2/15 | + 8 | Сапрпель |
| 12 | ер/21 | + 18 | Возд. почва эпифитов из корзинок |
| 13 | ер/10 | - 3 | Возд. почва эпифитов из корзинок |
| 14 | S 20/14 | + 7 | Аллювиальная почва, 20 см |
| 15 | L/28 | + 23 | Опад |
| 16 | ер/28 | + 17 | Возд. почва эпифитов из корзинок |

| | | | |
|----|---------|-----|----------------------------------|
| 17 | S 20/21 | + 4 | Аллювиальная почва, 20 см |
| 18 | ер/27 | + 6 | Возд. почва эпифитов из корзинок |

*Номер образца почвы указан в соответствии с данными Главы «Объекты и методы исследования»

**Номера штаммов приведены по внутренней классификации кафедры Биологии почв Факультета почвоведения МГУ им. М.В.Ломоносова.

Так как на развитие семян могли оказывать влияние и стимулирующие биологически активные вещества, выделяемые актиномицетами, был проведен посев обработанных семян в песок. В случае, если микроорганизмы действительно выделяют стимулирующие вещества, на почвах и на песке должны были наблюдаться сходные величины стимуляции.

Однако проведенные эксперименты показали, что стимуляция семян актиномицетами штаммов а 3, ер/28, ер/21, L/28 на песке практически отсутствует. Следовательно, биологическая активность при обработке семян данными штаммами основана на их способности потреблять аллелотоксины.

Для дополнительной проверки способности микроорганизмов потреблять аллелотоксины изучили развитие актиномицетов на среде с кумарином, который является распространенным аллелотоксином (Гродзинский и др., 1979), в качестве основного источника питания.

Было установлено, что штаммы, которые не стимулируют прорастание семян в почвах (рис. 4, А), развиваются на среде с кумарином значительно хуже, чем актиномицеты, которые улучшают развитие семян (рис. 4, Б).



Рис. 4. Рост штаммов актиномицетов рода *Streptomyces* 51 (А) и L/28 (Б) на среде с кумарином.

Таким образом, штаммы актиномицетов, которые стимулируют развитие семян в почвах и хорошо развиваются на аллелотоксинах (кумарине) способны снижать влияние этих соединений на прорастание семян. Полученные результаты также подтверждают корректность использования разработанной методики биотестирования для оценки влияния почвенной аллелотоксичности на прорастание семян.

3. Снижение негативного влияния аллелотоксинов при использовании сорбционных смесей

Из литературы известно (Котельников и др., 2022; Соколова, 2020), что сорбционной способностью к аллелотоксинам обладают глинистые минералы. При этом также установлено (Куликова, 1999; Fukushima et al., 2014; Li et al., 2003), что комплексы из гуматов и глинистых минералов лучше сорбируют органические вещества при совместном применении, поэтому для ограничения негативного влияния почвенных аллелотоксинов на прорастание семян использовали бентонито-гуматовую смесь.

Проведенные эксперименты показали, что для некоторых сортов пшеницы (Лиза и Злата) семена, обработанные бентонито-гуматовой смесью, демонстрируют заметно лучшее развитие в условиях почвенной аллелотоксичности в сравнении с необработанными семенами (Таблица 4). Однако для других сортов (Любава, Эстер и РИМА) обработка семян замедляла их прорастание.

Таблица 4. Влияние предпосевной обработки семян препаратом на основе кальциевого бентонита с гуматом на дерново-подзолистой почве (9)*

| Сорт яровой пшеницы | Эффект, % |
|---------------------|-----------|
| Лиза | + 30±5 |
| Злата | + 25±5 |
| Агата | + 4±3 |
| Любава | - 7±3 |
| Эстер | - 14±4 |
| РИМА | - 17±4 |

*Номер образца почвы указан в соответствии с данными Главы «Объекты и методы исследования»

Для объяснения полученных данных было выдвинуто предположение, что семена могут потреблять из почв не только аллелотоксины, но и стимулирующие биологически активные вещества (БАВ). В этом случае использование сорбентов с широким набором активных центров для предпосевной обработки может приводить к закреплению не только аллелотоксинов, но и почвенных БАВ, стимулирующих прорастание семян.

Для предотвращения возможной сорбции БАВ, поступающих в семена из почв, в бентонито-гуматовую смесь добавили автолизат пивных дрожжей (АПД), содержащий витамины, аминокислоты, пептиды и другие полезные вещества (Чичина, 2014). Введение АПД могло заполнить те активные центры, на которых закрепляются полезные почвенные БАВ, сохранив при этом участки, на которых способны закрепляться аллелотоксины. В результате проведенных опытов установлено, что эффективность применения бентонито-гуматовой смеси при введении АПД была заметно улучшена. Отметим, что индивидуальное использование АПД не оказывало значимого влияния на прорастание семян.

Таким образом, был предложен состав (БК – Гумат – АПД), который не только закреплял почвенные аллелотоксины, но и в минимальной степени сорбировал БАВ, поступающие из почвы и необходимые для прорастания семян и развития из них растений (Таблица 5). Этот препарат давал возможность в полной мере реализовать потенциал существующих веществ-стимуляторов для предпосевной обработки семян.

Таблица 5. Положительные и отрицательные свойства компонентов сорбционного препарата

| Компонент | Положительные св-ва | Отрицательные св-ва |
|--------------------------|--|--|
| Бентонит кальция-Гумат | Поглощает аллелотоксины | Поглощает БАВ-стимуляторы из почв |
| Автолизат пивных дрожжей | Предотвращает закрепление БАВ-стимуляторов из почв | Эффективность вне бентонито-гуматовой смеси низкая |

4. *Повышение эффективности ранее известных стимуляторов при снижении негативного влияния почвенной аллелотоксичности*

На следующем этапе работы провели исследование ранее известных веществ стимуляторов в составе бентонито-гуматовой смеси, содержащей и не содержащей АПД, в сравнении с их индивидуальным использованием (Таблица 6).

Таблица 6. Влияние предпосевной обработки семян пшеницы препаратов на основе бентонито-гуматовой смеси с добавлением и без добавления автолизата пивных дрожжей

| Сорт пшеницы | Номер почвы | Состав препарата *, г/л | Эффект, % |
|--------------|-------------|-------------------------------|-----------|
| Лиза | 2 | БК-Г-ФК (40-10-1) | +12±3 |
| | | БК-Г-АПД-ФК (40-10-12-1) | +24±4 |
| | 2 | БК-Г-ЯК (40-10-0,06) | +8±3 |
| | | БК-Г-АПД-ЯК (40-10-12-0,06) | +23±4 |
| | 2 | БК-Г-ЩК (40-10-2) | + 7±3 |
| | | БК-Г-АПД-ЩК (40-10-12-2) | +21±4 |
| | 2 | БК-Г-Бутон (40-10-2) | +8±3 |
| | | БК-Г-АПД-Бутон (40-10-12-2) | +34±5 |
| | 3 | БК-Г-ПАБК (40-10-0,75) | +28±5 |
| | | БК-Г-АПД-ПАБК (40-10-12-0,75) | +31±5 |
| Любава | 1 | БК-Г-ФК (40-10-1) | 0±3 |
| | | БК-Г-АПД-ФК (40-10-12-1) | +25±5 |
| | 1 | БК-Г-ЯК (40-10-0,06) | -9±3 |
| | | БК-Г-АПД-ЯК (40-10-12-0,06) | +20±4 |
| | 1 | БК-Г-ЩК (40-10-2) | -16±4 |
| | | БК-Г-АПД-ЩК (40-10-12-2) | +19±4 |
| | 9 | БК-Г-Бутон (40-10-2) | +2±3 |
| | | БК-Г-АПД-Бутон (40-10-12-2) | +25±5 |
| | 2 | БК-Г-ПАБК (40-10-0,75) | -2±3 |
| | | БК-Г-АПД-ПАБК (40-10-12-0,75) | +11±3 |

*БК – бентонит кальциевый; Г – гумат; ФК – фумаровая кислота; ЯК – янтарная кислота; ЩК – щавелевая кислота; Бутон – препарат «Бутон»; ПАБК – парааминобензойная кислота.

При использовании разработанного препарата в сочетании с субстратами дыхательного метаболизма (фумаровая, янтарная и щавелевая кислота), гормонами роста растений (3-индолилуксусная кислота, гиббереллиновая кислота и др.), а также стимуляторами широкого спектра действия было обнаружено, что для этих веществ эффективность действия в составе с бентонитом кальция, гуматом и АПД возрастает с 4-9% до нескольких десятков процентов. Обращает на себя внимание, что использование бентонито-гуматовой смеси с АПД во всех случаях оказывается более эффективным, чем без него (см. Таблицу 5).

Проведенная проверка по добавлению в разработанный состав нескольких биологически активных веществ с целью улучшения наблюдаемых эффектов на яровой пшенице Лиза позволила найти состав, содержащий бентонит кальция, гумат, АПД, гиббереллин и полиэтиленгликоль (ПЭГ), который показал наилучший эффект стимуляции на уровне 56% (Таблица 7, столбец 2). При проверке эффективности данного состава на других сортах было обнаружено снижение величины стимуляции для сортов Любава и Злата и практически полное её отсутствие для сорта Агата.

Таблица 7. Эффективность различных стимуляторов прорастания семян яровой пшеницы на дерново-подзолистой почве (9)*, %. Контроль – длина проростков семян, необработанных стимуляторами.

| Сорт | Бентонит кальция, гумат, автолизат пивных дрожжей, полиэтиленгликоль, 90-% гиббеллиновая кислота | Бентонит кальция, гумат, автолизат пивных дрожжей, полиэтиленгликоль, 90-% гиббеллиновая кислота 3-индолилуксусная кислота, 6-бензиламинопурин |
|--------|--|--|
| Лиза | 56±5 | 32±3 |
| Любава | 32±3 | 5±2 |
| Злата | 33±4 | 19±3 |
| Агата | 4±2 | 34±4 |

*Номер образца почвы указан в соответствии с данными Главы «Объекты и методы исследования»

В соответствии с теорией лимитирующего фактора, ограничивает развитие семян вещество, концентрация которого в наибольшей степени отклоняется от оптимальной.

Принимая во внимание, что АПД, входящий в препарат, содержит витамины, аминокислоты, пептиды и другие полезные вещества (Чичина, 2014), их нехватка не может лимитировать прорастание семян. Поэтому было изучено влияние добавления различных фитогормонов в состав препарата на стимуляцию яровой пшеницы сорта Агата.

При подборе веществ и их концентраций был получен состав, который наряду с бентонитом кальция, гуматом, АПД, ПЭГ и гиббереллиновой кислотой, также содержал 3-индолилуксусную кислоту и 6-бензиламинопурин (Таблица 7, столбец 3). Его эффективность в сравнении с ранее разработанным составом была улучшена на 30%. Однако при проверке его действия на других сортах (Лиза, Любава и Злата) было обнаружено, что величины стимуляции для них заметно снижались (Таблица 7, столбец 3).

На основе представленных результатов можно сделать вывод, что семена изученных сортов яровой пшеницы отличаются по своему балансу фитогормонов, что, наряду с аллелотоксичностью почв, оказывает значимое влияние на эффективность стимуляторов прорастания семян.

Так как гиббереллин стимулирует развитие семян значительно чаще других фитогормонов, состав, содержащий бентонит, гумат, АПД, ПЭГ и гиббереллиновую кислоту, был проверен на других сортах и культурах (яровой ячмень, озимая пшеница, озимая рожь). Проведенные лабораторные эксперименты показали, что более чем в 90% случаев при применении состава отмечены эффекты стимуляции различной величины достоверные при 95% доверительной вероятности. Это позволяло перейти к проверке эффективности препарата в полевых условиях.

5. Проверка влияния разработанного сорбционно-стимулирующего препарата на полевую всхожесть семян

Для проверки эффективности сорбционно-стимулирующего препарата были проведены мелкоделяночные опыты на территории Орловской области на яровой пшенице сорт Гранни. Дисперсионный анализ полученных данных, проведенный при помощи программного обеспечения RStudio, выявил

наличие значимой разницы по критериям Тьюки и НСР при 95% доверительной вероятности для полевой всхожести и проективного покрытия при 90% доверительной вероятности.

Выводы

1. Проведенное изучение существующих подходов к оценке почвенной аллелотоксичности показало, что методы химического анализа почв не позволяют оценить совместное влияние комплекса аллелотоксинов на растения, поэтому основным подходом для изучения данного свойства является биотестирование.
2. Аллелотоксичность изученных дерново-подзолистых почв во всех вариантах опыта с сортами яровой пшеницы снижает скорость развития семян зерновых культур даже в образцах залежных почв. Минимальное влияние аллелотоксичности отмечено на каштановой почве под залежью. При этом замедление развития семян почвами зависит от их сорта, т.е. сорт, проявляющий наибольшую устойчивость к комплексу аллелотоксинов одной почвы, будет сохранять это свойство относительно других сортов при переходе к другой почве.
3. Использование сорбционных составов для стимуляции семян за счёт закрепления аллелотоксинов эффективно для яровой пшеницы сортов Лиза и Злата. Добавление автолизата пивных дрожжей в бентонитогуматовую смесь позволяет повысить универсальность препарата за счёт заполнения активных центров сорбента, которые могут закреплять стимулирующие вещества, поступающие из почв в семена.
4. Совместное применение состава на основе бентонита кальция, гумата и автолизата пивных дрожжей в сочетании с субстратами дыхательного метаболизма, гормонами роста растений, стимуляторами широкого спектра действия, исследованными в работе, позволяет значительно увеличить эффективность их использования для предпосевной обработки семян исследованных зерновых культур в лабораторных и полевых условиях.

Научные статьи, опубликованные в журналах из списков Scopus, WoS, RSCI, а также в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.15 – Экология:

1. Fedotov G.N., Shoba S.A., Fedotova M.F., **Gorepekin I.V.** The Impact of Soil Allelotoxicity on Germination of Grain Seeds // Eurasian Soil Science. - 2019. - Vol. 52. №. 4. - P. 448 - 454. DOI 10.1134/S1064229319040057 – Scopus SJR (2022): 0.428 (количество печатных листов - 0,64/ личный вклад - 0,21).
2. Fedotov G.N., **Gorepekin I.V.**, Lysak L.V. Possibility of Reducing Soil Allelotoxicity for Grain Crops // Eurasian Soil Science. - 2020. - Vol. 53. - № 1. - P. 110-116. DOI 10.1134/s106422932001007x – Scopus SJR (2022): 0.428 (0,80/0,27).
3. Fedotov G.N., **Gorepekin I.V.**, Pozdnyakova A.D., Zavgorodnyaya Yu A., Isakova S.A. Relationship of Land Use History and Chemical Properties of Soils with Their Allelotoxicity // Eurasian Soil Science. - 2020. - Vol. 53. - №. 3. - P. 389-395. DOI 10.1134/s1064229320030035 – Scopus SJR (2022): 0.428 (0,76/0,3).
4. Fedotov G.N., Shoba S.A., **Gorepekin I.V.** Soil Allelotoxicity and Methods to Reduce Its Adverse Influence at the Initial Stage of Plant Development // Eurasian Soil Science. - 2020. - Vol. 53. №. 8. - P. 1165-1172. DOI 10.1134/S1064229320080062– Scopus SJR (2022): 0.428 (0,89/0,58).
5. Fedotov G.N., **Gorepekin I.V.**, Lysak L.V., Potapov D.I. Soil Allelotoxicity and Creation of Sorption-Stimulating Preparation to Accelerate Plant Development from Spring Wheat Seeds at Early Stages // Eurasian Soil Science. - 2020. - Vol. 53. - №. 9. - P. 1302-1310. DOI 10.1134/S1064229320090045 – Scopus SJR (2022): 0.428 (1,04/0,35).
6. Shoba S.A., **Gorepekin I.V.**, Fedotov G.N., Gracheva T.A. Plant Growth Hormones Increase the Stimulation Efficiency of Seedlings Development for Spring Wheat Seeds upon Pre-sowing Treatment // Doklady Biological Sciences. - 2020. Vol. 493. - P. 128–131. DOI 10.1134/S0012496620040080 – Scopus SJR (2022): 0,216 (0,45/0,15).

7. **Горепекин И.В.**, Федотов Г.Н. Оценка возможности разработки высокоэффективного универсального стимулятора для предпосевной обработки семян зерновых культур // Вестник Московского университета. Серия 17. Почвоведение. – 2021. – №2. – С. 38-44. – IF РИНЦ (2021): 0,453 (0,69/0,52).
8. Shoba S.A., Gracheva T.A., Stepanov A.L., Fedotov G.N., **Gorepekin I.V.** On the Nature of the Influence of Some Mycelial Actinobacteria on the Spring Wheat Seeds Germination in Soils // Doklady Biological Sciences. - 2021. - Vol. 498. - P. 85–88. DOI 10.1134/S0012496621030030 – Scopus SJR (2022): 0,216 (0,42/0,14).
9. Shoba S.A., Fedotov G.N., **Gorepekin I.V.**, Potapov D.I., Gracheva T.A. On the Sorption-Stimulating Preparations Influence on Seed Germination // Doklady Biochemistry and Biophysics. - 2021. - Vol. 499. - P. 238–241. DOI10.1134/S1607672921040165 – Scopus SJR (2022): 0.197. (0,48/0,16).
10. Potapov D.I., Shvarov A.P., **Gorepekin I.V.**, Salimgareeva O.A., Fedotov G.N. Effect of Soil Samples Preparation on Their Thermal Hydrophysical Properties and Allelotoxicity // Eurasian Soil Science. - 2022. - Vol. 55. - №. 3. - P. 315-325. DOI 10.1134/S1064229322030115 – Scopus SJR (2022): 0.428 (1,06/0,35).
11. **Gorepekin I.V.**, Fedotov G.N., Shoba S.A. Allelotoxicity of soils: A review // Eurasian Soil Science. - 2022. - Vol. 55. - №. 12 - P. 1804–1812. DOI 10.1134/S1064229322700090 – Scopus SJR (2022): 0.428 (1,18/0,7).

По теме диссертации также получено 18 патентов на изобретения. Полный список публикаций на странице соискателя в ИАС «Истина»:
<https://istina.msu.ru/profile/Gorepekin/>