ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2012, том 48, № 4, с. 394–402

УДК 581.1:633.358:577.13

# РОЛЬ АЛЛЕЛОПАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В РЕГУЛЯЦИИ И ФОРМИРОВАНИИ БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА

© 2012 г. Л. Е. Макарова*, В. И. Смирнов**, Л. В. Клыба**, И. Г. Петрова*, Л. В. Дударева*

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН

**Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, Иркутск, 664033

e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 07.10.2011 г.

Показано, что соединения ароматического ряда, изолированные из корневых экссудатов трех видов бобовых растений (*Pisum sativum* L., *Vicia faba* L. var. *major Hartz* , *Glycine max* L. MERR), идентифицированные как N-фенил-2-нафтиламин, дибутиловый и диоктиловый эфиры орто-фталевой кислоты, известные как негативные аллелопатические вещества, участвуют в контролировании формирования бобово-ризобиального симбиоза после инокуляции корней ризобиями и в неблагоприятных для симбиоза условиях.

Важную роль в агрофитоценозах отводят бобовым растениям в связи с их уникальным свойством формировать на корнях клубеньки, в клетках которых поселяются азотфиксирующие бактерии семейства Rhizobiaceae. Наряду с ассимиляцией $N_2$ бобовые растения и их микросимбионты вносят в экосистемы большой вклад в улучшение и оздоровление почвы [1, 2]. Последнее определяется, во-первых, их способностью аккумулировать и катаболизировать многие накапливающиеся в почве пестициды и другие, вредные для живых организмов вещества и, во-вторых, воздействием на почвенную микрофлору аллелопатическими соединениями, выделяемыми их корнями.

В корневых экссудатах бобовых растений наряду с привлекающими микроорганизмы углеводами, аминокислотами и оксидикарбоновыми кислотами [3] выявлены фенольные соединения (**ФС**) [4], состав которых достаточно разнообразен [4–6]. Разнообразны и функции ФС, выделяемых этими растениями во внешнюю среду. Так, ряд ФС, из числа присутствующих в корневых экссудатах, может подвергаться катаболизму под действием микроорганизмов и служит для них трофическим материалом [7, 8]. ФС являются растительными сигнальными молекулами, индуцирующими у ризобий биосинтез Nod-факторов, инициирующих процессы инфицирования и нодуляции [9]. В корневых экссудатах бобовых растений выявлены фитоалексины изофлавоноидного происхождения, подавляющие почвенную микрофлору [2, 10–12], за исключением, по-видимому, бактерий *Rhizobium* [13, 14].

За экскрецию ФС, воздействующих на ризобии, ответственны определенные области корня [15, 16], по-видимому, включающие зоны преимущественного выделения фенольных индукторов или ингибиторов экспрессии ризобиальных *nod*-генов [17].

Как показано рядом исследований, количество секретируемых фенольных соединений зависит от целого ряда обстоятельств [5, 6, 18–21]. Оно по мере роста и развития растения меняется альтернитивно. Происходит усиление экссудации фенольных соединений в начале взаимодействия с симбиотическими микроорганизмами и ее снижение при неблагоприятных условиях среды. По-видимому, благодаря количественным и качественным изменениям в составе комплексов фенольных соединений корневых экссудатов осуществляется регуляция этими веществами процесса размножения ризобий и индукции у этих бактерий синтеза Nod-факторов [5, 6, 20, 21].

У растений гороха в неблагоприятных условиях замедление начальных этапов формирования симбиоза сопряжено не только с уменьшением экссудации корнями ФС, но и с понижением ростовой активности этих веществ в отношении ризобий [5, 6]. Все возникающие изменения в комплексах ФС корневых экссудатов, по-видимому, имеют отношение к механизмам авторегуляции, контролирующим периодичность инфицирования корней и образования на них клубеньков в ходе развития корневой системы растения-хозяина и лимитирующим число клубеньков на его корнях в неблагоприятных условиях.

Обнаруженные изменения ростовой активности изученных экстрактов из корневых экссудатов, по нашему предположению, обусловлены содержанием в этих экссудатах ряда ароматических компонентов с негативным аллелопатическим эффектом. В их числе идентифицированный нами N-фенил-2-нафтиламин, обозначенный при первом его обнаружении в экссудатах гороха как

вещество "X" [5], и дибутиловый и диоктиловый эфиры орто-фталевой кислоты, представляемые в числе фенольных компонентов корневых экссудатов бобовых растений впервые в настоящей публикации. Все они отнесены к числу неблагоприятных для живых организмов аллелопатических веществ растительного происхождения [22–26].

Цель работы – получение доказательств участия аллелопатических соединений, присутствующих в корневых экссудатах бобовых растений, в контролировании численности ризобий в ризосфере в начальные периоды после инокуляции и в неблагоприятных для формирования бобово-ризобиального симбиоза условиях.

## МЕТОДИКА

**Объект исследования. Схема проведения эксперимента.** Исходным растительным материалом служили 2 сут этиолированные проростки гороха (сорт Ямальский), бобов (сорт Русские черные), сои (сортообразец № 15, получен в СИФИБР СО РАН, Иркутск), выросшие в термостате при 22°С без освещения. Эти проростки помещали в водную среду, содержащую необходимый для их роста минимальный набор микроэлементов, вносимых в водную среду по [5], которая ежедневно заменялась. Дальнейшее выращивание растений на водной среде проводили в термостате при 22°С без освещения или в камере фитотрона с температурой 20–22°С, влажностью воздуха около 60% и освещением (2.1 клк) с 13-часовым фотопериодом. При этом влияние освещения и инокуляции на состав фенольных соединений корневых экссудатов изучали только на растениях гороха.

**Инокуляция.** Инокулят, содержащий бактерии *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, штамма 1060 (244б) (эффективный, получен из ВНИИ с/х микробиологии, Пушкин, С.-Петербург), вносили в водную среду, на которую помещали проростки гороха, только в 1 сут эксперимента.

**Получение экстрактов ФС из корневых экссудатов.** ФС извлекали из водной среды в этилацетат после подкисления ее с помощью HCl до pH 3.0–4.0. После упаривания этилацетата в токе холодного воздуха остаток растворяли небольшим объемом 96%-ного этанола.

**Изолирование N-фенил-2-нафтиламина и сложноэфирных соединений о-фталевой кислоты из экстрактов.** Изоляцию присутствующих в этанольных экстрактах фенольных соединений производили последовательно, применяя хроматографию на бумаге, на колонке с Sephadex LH-20 ("Pharmacia Fine Chemical AB Uppsala", Швеция), ТСХ (Silufol UV-254, "Kavalier", Чехословакия). С помощью бумажной хроматографии в 5%-ной уксусной кислоте отделяли неподвижные в указанном растворе компоненты, которые элюировали в 96%-ный этанол и затем наносили на колонку с Sephadex LH-20. Пропускаемый через колонку 96%-ный этанол, содержащий 0.002% HCl, делили на фракции объемом 1.0 или 3.5 мл. Исследуемые вещества отделяли от сопутствующих им компонентов в содержащих их фракциях методом ТСХ, применяя последовательно ряд систем (об./об.): толуол–1,4-диоксан–уксусная кислота (ТДУ, 90 : 25 : 4); хлороформ–бензол–уксусная кислота (ХБУ, 100 : 100 : 1); хлороформ–этанол (4 : 1); хлороформ–уксусная кислота (3 : 2); н-бутанол–уксусная кислота–вода (4 : 1 : 2); бензол–уксусная кислота–вода (125 : 72 : 3 или 6 : 7 : 3).

**Идентификация N-фенил-2-нафтиламина и сложноэфирных соединений о-фталевой кислоты.** Доказательства химической структуры этих веществ, изолированных из экстрактов по описанной выше схеме, получили с применением методов УФ-, ИК-спектроскопии, ГХ-МС-анализа. Для полноты подтверждения идентичности структуры N-фенил-2-нафтиламина провели ЯМР-анализ.

УФ-спектры получены на спектрофотометре Specord S100 ("Analytik Jena", Германия) и исследованы с внесением в растворы щелочных и комплексообразующих реагентов [27, 28]. ИК-спектры записаны с помощью однолучевого спектрофотометра "Spectrum One" (США), оснащенного детектором "MIR TGS" и программами библиотек спектров Nicolet/Aldrich и Pelibs ("Perkin Elmer", США), предназначенных для идентификации функциональных групп ИК-спектров. Для получения ИК-спектров концентрированные растворы веществ в этилацетате наносили на пластинки "KRS-5" ("Макрооптика, ООО", Россия).

Масс-спектры электронной (ЭИ, 70 эВ) и химической ионизации положительных ионов (газ-реагент – метан) получены на приборе GCMS-5975C inert XL EI/CI MSD фирмы "Agilent", США (масс-анализатор квадрупольный, диапазон детектируемых масс 34-950Да). Хроматографическое разделение проводили на капиллярной колонке (30 м × 250 мкм × 0.25 мкм) фаза марки HP-5ms, газ-носитель – гелий. Температура испарителя и источника ионов 250°С. Режим программирования – от 40 до 250°С со скоростью 5°С мин$^{-1}$. Для интерпретации использовалась электронная библиотека – NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Ver. 2.0.2005.

Спектры ЯМР $^{1}$H, $^{13}$C регистрировали на мультиядерном Фурье ЯМР спектрометре Bruker DPX-400 ("Bruker", Германия), рабочая частота 400.1 ($^{1}$H) и 100.4 ($^{13}$C) МГц с внешним стандартом – гексаметилдисилаксаном.

**Анализ содержания N-фенил-2-нафтиламина и сложноэфирных соединений о-фталевой кислоты методом ВЭЖХ.** Содержание изучаемых веществ в этанольных экстрактах из экссудатов осуществляли на хроматографе Shimadzu LC-10ATvp с УФ-

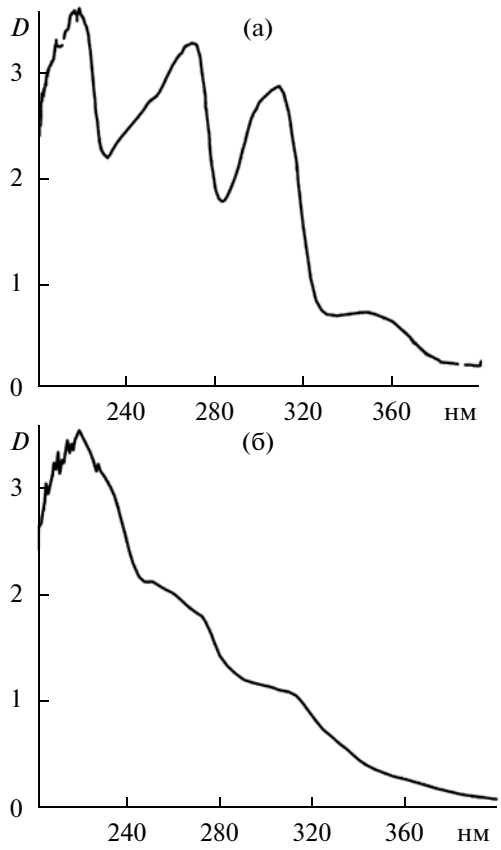


**Рис. 1.** Спектры поглощения в 96%-ном этаноле выделенных из корневых экссудатов растений гороха N-фенил-2-нафтиламина (а) и вещества "К" (б).

детектором ("Shimadzu", Япония). Разделение содержавшихся в экстрактах фенольных компонентов проводили на колонке Separon SGX $C_{18}$, 5 мк (150 × 3 мм) в возрастающем градиенте концентрации А:Б от 30 до 90% в течение 60 мин. А – ацетонитрил, Б – 0.1 М перхлорат Li с 0.1% трифторуксусной кислоты, pH = 4.0. Количественные расчеты производились по адсорбционным профилям при 280 нм с использованием калибровочного графика, построенного для разных концентраций изучаемых веществ. Для N-фенил-2-нафтиламина и сложноэфирных соединений о-фталевой кислоты показатели времени удерживания в адсорбционных профилях исследуемых экстрактов подтверждали УФ-спектрами, полученными для этих веществ в остановленном потоке элюента.

**Изучение влияния изолированных из экссудатов веществ на размножение *Rhizobium*.** Определение ростовой активности ФС в размножении бактерий *Rhizobium* осуществляли в жидкой минимальной среде в соответствии с принципами, изложенными в работе [29].

**Статистическая обработка**. Средние значения и их стандартные ошибки (рис. 6, 7) получены по данным из трех независимых экспериментов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В течение 3 сут в корневых экссудатах неинокулированных и инокулированных растений гороха (*Pisum sativum* L.), выращиваемых на свету или в темноте (соответственно, позитивный и негативный факторы), прослеживали изменения и различия после инокуляции ризобиями в содержании N-фенил-2-нафтиламина и вещества "К" (смеси сложноэфирных соединений о-фталевой кислоты). Следует заметить, что перечисленные выше вещества нами были обнаружены не только в корневых экссудатах, но и в тканях корней гороха.

С целью выяснения универсальности значения в регуляции бобово-ризобиального симбиоза

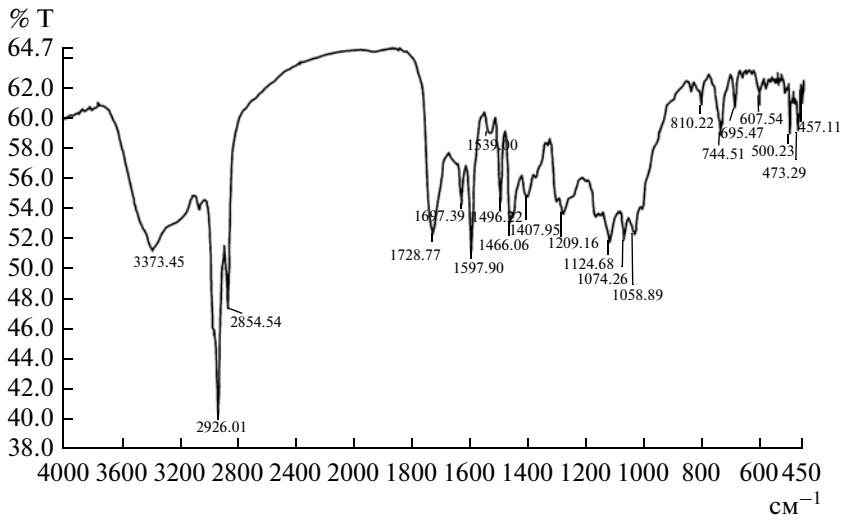


**Рис. 2.** ИК-спектр N-фенил-2-нафтиламина, выделенного из корневых экссудатов гороха.

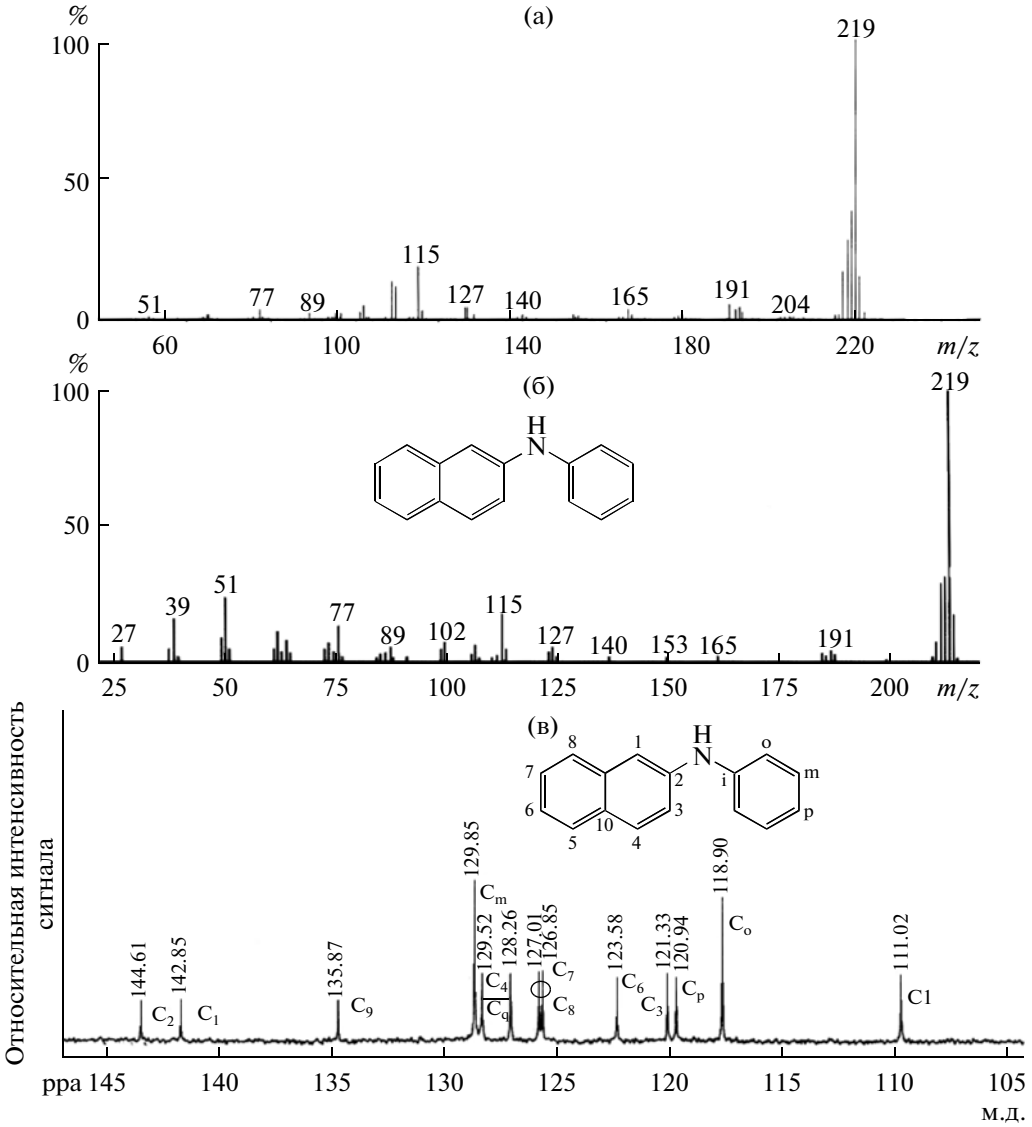


**Рис. 3.** Спектры, характеризующие структуру выделенного из корневых экссудатов растений гороха N-фенил-2-нафтиламина.

Масс-спектры образца, выделенного из корневых экссудатов растений гороха (а) и N-фенил-2-нафтиламина из электронной библиотеки (Mass Spectral Database) (б); ЯМР-спектр 13Cjmod N-фенил-2-нафтиламина, выделенного из корневых экссудатов растений гороха, в $CDCl_3$ (в). По оси абсцисс – величина химического сдвига (м.д.), по оси ординат – относительная интенсивность, %.

занимались изучением присутствия этих веществ в экссудатах двух других представителей бобовых растений – *Vicia faba* L. var. *major Hartz* и *Glycine max* L. MERR. Наличие в экстрактах из экссудатов перечисленных двух видов бобовых растений N-фенил-2-нафтиламина и сложноэфирных соединений о-фталевой кислоты подтверждали по ряду тестовых показателей подвижности на хроматограммах и окраски с реагентами на фенольные соединения (часть их представлены в таблице) и УФ-спектрам (рис. 1), установленными нами ранее [5]. N-фенил-2-нафтиламин, дибутиловый и диоктиловый эфиры о-фталевой кислоты выявлены нами в составе этилацетатных экстрактов из их корневых экссудатов у проростков бобов и сои, росших в течение 3 сут на водной среде без света.

Подтверждениями химической структуры N-фенил-2-нафтиламина, каковыми являются данные, представленные на рис. 1а, 2 и 3. В ИК-спектре (рис. 2) доказательством принадлежности данного вещества к ароматическим соединениям являются полосы в областях 3000–3100; 1575–1625; 1475–1530; 0660–0825 $см^{-1}$. Полосы средней интенсивности при 3008 и 1635 $см^{-1}$ наиболее заметны среди них. Полосы в областях 3350–3500; 2850–2990; 1570–1620; 1418–1465; 0750–0950 $см^{-1}$

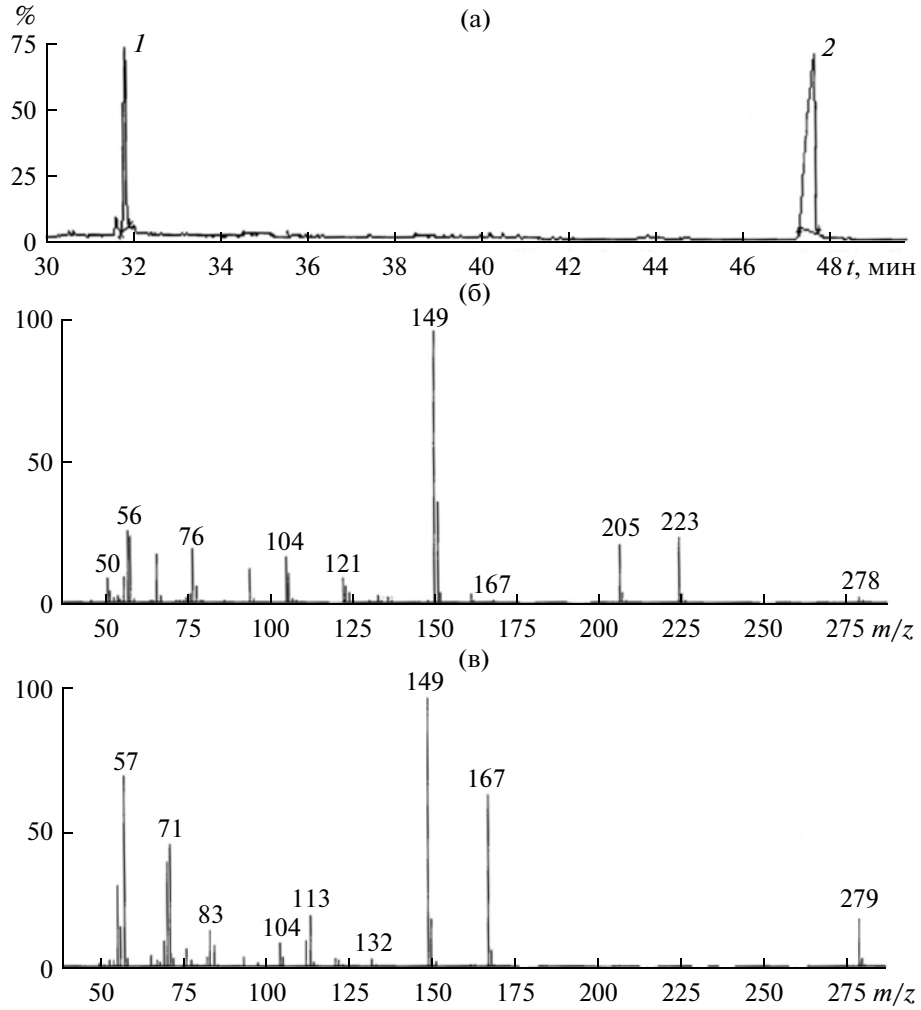


**Рис. 4.** Характеристика компонентов, составляющих вещество "К".
На ГХ-МС (а) пик 1 соответствует дибутиловому, пик 2 – диоктиловому эфирам орто-фталевой кислоты. Масс-спектры дибутилового (б) и диоктилового (в) эфиров о-фталевой кислоты.

указывают на присутствие аминогруппы. Наиболее выражены из них широкая полоса средней интенсивности при 3374 $см^{-1}$ и интенсивная полоса при 2926 $см^{-1}$. Полоса при 3373 $см^{-1}$ свидетельствует о наличии в исследованной молекуле ассоциированной NH-группы [30].

Масс-спектры на рис. 3а и 3б свидетельствуют об идентичности выделенного нами соединения и N-фенил-2-нафтиламина из электронной библиотеки – NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Ver. 2.0.2005. В обоих масс-спектрах основным по интенсивности является пик молекулярного иона ($M^+$ 219).

На рис. 3в представлен ЯМР-спектр $^{13}$CJMOD (спектр $^{13}$CJ-модулированного спинового эхо JMOD) раствора в $CDCl_3$ выделенного нами соединения, который показывает, что изучаемое соединение содержит 16 углеродных атомов и из них 10 CH=-углеродов и 3 $C_{qw}$ (четвертичных) в ароматической области и 1 метиленовой группы ($CH_2$ – несвязанная с кислородом), являющиеся подтверждениями структуры N-фенил-2-нафтиламина.

Еще один компонент экссудатов, которому уделялось внимание в исследованиях, было условно обозначено нами как вещество "К" (обозначение связано с красно-коричневатым цветом окраски у вещества на ТСХ, появляющейся после воздействия УФ-света). Выше указанные сложноэфирные соединения о-фталевой кислоты, составляющие вещество "К", элюировались с хроматограмм (при хроматографии на бумаге и методом ТСХ) в виде смеси, поскольку не получалось разделение их в использованных нами системах растворителей. Только результаты хромато-масс-спектроскопии показали, что вещество "К" имеет 2 пика (рис. 4а), соответствующие сложноэфирным соединениям, имеющим одинаковое арома-

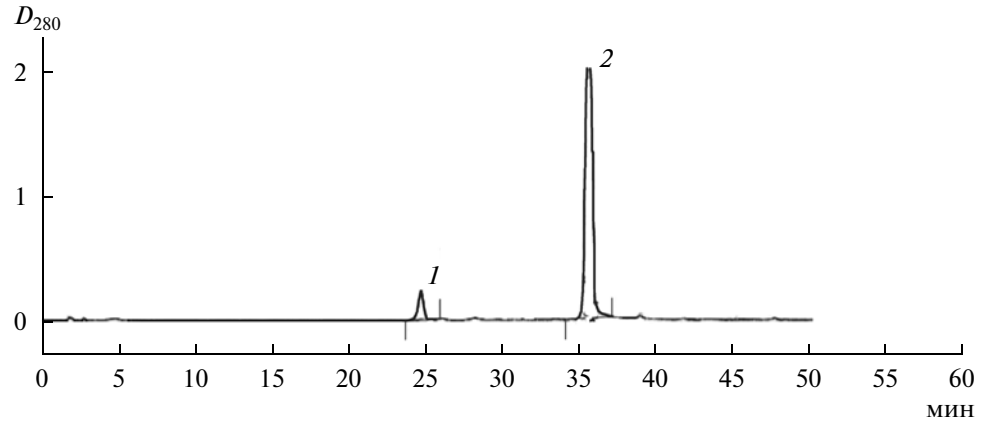


**Рис. 5.** ВЭЖХ изолированных из экстрактов корневых экссудатов гороха вещества "К" (*1*) и N-фенил-2-нафтиламина (*2*). По оси абсцисс – время удерживания; по оси ординат –поглощение при 280 нм.

тическое ядро: 1,2-бензендикарбоновая (ортофталевая) кислота (рис. 4б, в). Согласно данным электронной библиотеки спектров "CAS WILEY 229 Library", наиболее вероятно (коэффициент подобия 90%), что одно из них является дибутиловым ($\mathbf{M}^{+\cdot}$ 278 Да), второе – диоктиловым ($\mathbf{M}^{+\cdot}$ 390 Да) эфиром 1.2-бензолдикарбоновой кислоты. Об ароматической природе вещества "К" в его ИК-спектре свидетельствовали полоса в области 3061 $см^{-1}$ и ряд полос в областях 1565–1625, 1475–1530, 660–825 $см^{-1}$, и на принадлежность данного соединения к ароматическим эфирам указывали полосы в областях 1294, 1456, 1499 $см^{-1}$ (программа библиотек спектров Nicolet/Aldrich и Pelibs) [30; 31].

На рис. 5 приведены адсорбционные профили, полученные при разделении методом ВЭЖХ смеси вещества "К" и N-фенил-2-нафтиламина, изолированных из корневых экссудатов гороха.

Количественные показатели для этих веществ на рис. 6 в течение трехсуточного периода наших наблюдений свидетельствуют об изменении их содержания в экссудатах растений гороха под влиянием инокуляции и условий освещения. Больше этих веществ в экссудатах растений, росших в темноте.

Переходя к анализу особенностей секреции корнями гороха каждого из изучаемых соединений, следует отметить, что количество N-фенил-2-нафтиламина в расчете на 1 растение заметно выше в их экссудатах в условиях темноты, негативно влияющей на нодуляцию [35]. Примечательно, что из всех вариантов наших экспериментов наиболее низкие показатели содержания этого вещества можно отметить в 1 сут у неинокулированных растений, росших при освещении (рис. 6).

После инокуляции количество N-фенил-2-нафтиламина, выделяемое корнями, возрастало в 1 сут в экссудатах растений как при выращивании их в темноте, так и на свету, хотя и в разной мере. Аналогичный эффект инокуляции обнаружен и на секрецию корнями гороха вещества "К". Характерно, что во все периоды наблюдения суммарное количество сложноэфирных соединений о-фталевой кислоты (вещества "К") в экссудатах заметно меньше по сравнению с N-фенил-2-нафтиламином (рис. 6).

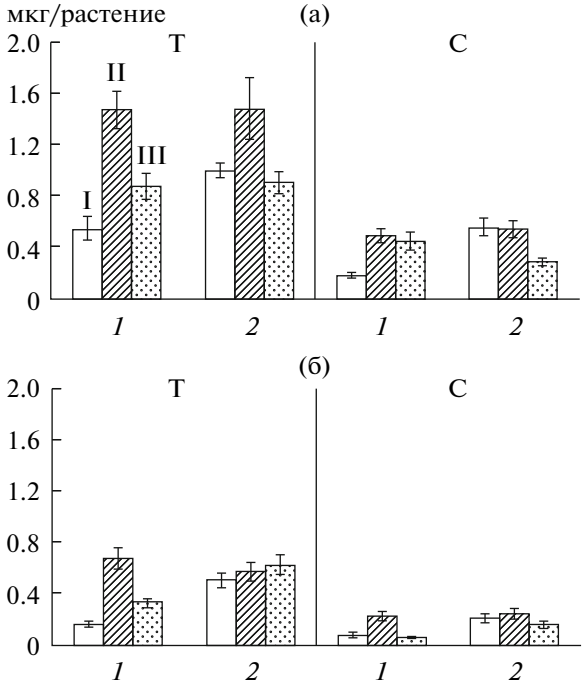


**Рис. 6.** Влияние условий освещения на количество N-фенил-2-нафтиламина (а) и вещества "К" (б), выделяемых за 1 сут корнями неинокулированных (*1*) и инокулированных (*2*) *Rhizobium* растений гороха в течение 3 сут наблюдений.

I, II, III – соответственно, 1, 2, 3 сут наблюдений. Т – темнота; С – свет.

Результаты хроматограмм фенольных соединений и основные показатели цветных реакций, характеризующих выделенные из корневых экссудатов соединения

| Образец | Флуоресценция | | | Окраска с реагентами | | | $R_f$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | УФ-свет | УФ-свет + + $NH_3$ | Видимый свет | ДПНА + + $Na_2CO_3$ | ДСК + + $Na_2CO_3$ | Ванилиновый реактив | ТДУ, 90 : 25 : 4 | ХБУ, 100 : 100 : 1 |
| N-фенил-2-нафтиламин | Ярко темно-фиолетовая | Усиливается | Слабо серая, на ярком свету до темно-красновато-сиреневой | Ярко сиреневая | Ярко вишневая | Окраски нет | 0.82 | 0.88 |
| Вещество "К" | Тускло коричневато-фиолетовая | Без изменений | Светло-красная | Яично-желтая | Розово-желтая | Окраски нет | 0.74 | 0.39 |
| Стильбен (?) | Синяя | Темно синяя | Голубоватая, меняющаяся на серовато-желтую | Желтовато-серая | Светло-желтая | Сиреневато-синяя | 0.76 | 0.25 |

Общее содержание в экссудатах обсуждаемых аллелопатических соединений как у неинокулированных, так и у инокулированных растений максимально на 2 сут от начала эксперимента (рис. 6). Ранее [35] в этот же период развития у растений гороха нами отмечалось начало роста латеральных корней, более активно развивающихся у инокулированных ризобиями растений. Не исключено, что в указанный период наблюдений из-за затрат энергии и пластического материала, связанных с началом обозначенного выше морфологического процесса, усиление экссудации корнями в ризосферу негативных аллелопатические веществ может быть направлено на ограничение их инфицирования ризобиями.

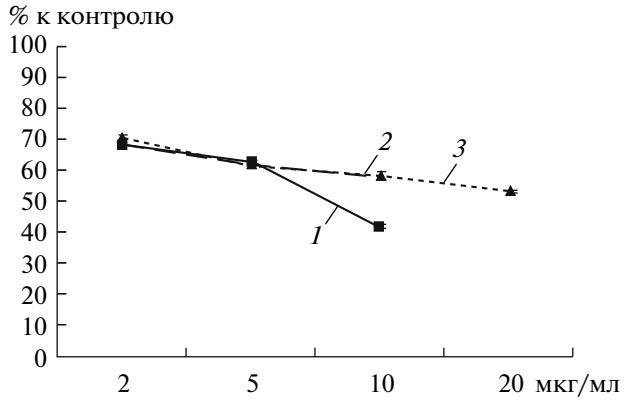


**Рис. 7.** Влияние разных концентраций ФС (мкг/мл среды), выделенных из корневых экссудатов гороха, на прирост бактерий *Rhizobium* за 24 ч в жидкой минимальной среде (% к контролю).

Контроль – среда без ФС, содержащая бактерии. *1* – стильбен; *2* – вещество "К"; *3* – N-фенил-2-нафтиламин.

Данные рис. 7 (*1*, *2*) свидетельствуют о том, что N-фенил-2-нафтиламин и сложноэфирные соединения о-фталевой кислоты могут участвовать в подавлении размножения ризобий (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*). Присутствие этих веществ в фенольном комплексе корневых экссудатов в определенной мере должно сказываться на численности ризобий в ризосфере бобового растения. Вероятно, скорость размножения ризобий вблизи корня растения-хозяина зависит от доли в фенольном комплексе его корневых экссудатов негативных аллелопатических веществ. К ним может быть причислено и обнаруженное нами ранее в экссудатах растений гороха, росших в темноте соединение, предварительно отнесенное нами к стильбенам [5], которое также оказывало ингибирующее действие на размножение ризобий (рис. 7, *1*). В таблице приведены некоторые тестовые показатели, характеризующие данное соединение, присутствие которого в экссудатах гороха в условиях освещения, а также в экссудатах сои и бобов нами пока не установлено.

Несмотря на общее высокое содержание в корневых экссудатах N-фенил-2-нафтиламина и сложноэфирных соединений о-фталевой кислоты их негативный эффект на размножение ризобий, возможно, отчасти снимается благодаря присутствию в экссудатах компонентов, положительно влияющих на данный процесс. Таковыми могут быть изофлавоны [5] и другие соединения растительных экссудатов, метаболизируемые и используемые ризобиями в качестве трофического материала [7, 8]. Тенденции изменения количества секретируемых растениями гороха N-фенил-2-нафтиламина и сложноэфирных соединений о-фталевой кислоты (рис. 6) после инокуляции ризобиями, а также при росте в условиях темноты, вместе с доказательством негативного

влияния этих веществ на размножение ризобий (рис. 7) объясняют причины обнаруженных нами ранее [5, 6] снижений ростовой активности фенольных комплексов, полученных из экссудатов корней тех же растений. Все это согласуется с данными работ [23–27], свидетельствующими о том, что обсуждаемые вещества являются негативными аллелопатическими соединениями, подавляющими микрофлору. Но при этом в литературе имеется мало сообщений о выявлении N-фенил-2-афтиламина и сложноэфирных соединений о-фталевой кислоты в растительных организмах. Так N-фенил-2-нафтиламин найден в органах надземной части пяти видов высших растений [32–34], в клетках водорослей [24], в тканях водного растения и его экссудатах [26]. Еще меньше информации о выявлении у растительных организмов сложноэфирных соединений о-фталевой кислоты (1,2-бензолдикарбоновая кислота). В работе [22] имеются сведения об антимикробных свойствах дибутилового эфира о-фталевой кислоты, выделенного из зеленых водорослей *Enteromorpha linza*. Надо заметить, что высокая токсичность дибутилового и диоктилового эфиров орто-фталевой кислоты для живых организмов достаточно известна [www.Chemblink.com].

Обнаружение нами обсуждаемых веществ в фенольных комплексах у трех видов бобовых культур, по-видимому, является прямым свидетельством распространения их у бобовых растений. Присутствие изученных соединений в корневых экссудатах проростков гороха, сои и бобов подтверждает возможность их универсальной контролирующей функции при формировании бобово-ризобиального симбиоза независимо от вида растения-хозяина.

Итак, из всего сказанного выше следует, что роль аллелопатических веществ в регуляции инфицирования бобовых растений ризобиями заключается в контролировании концентрации этих бактерий в ризосфере. В частности, необходимость в регуляции численности бактерий в ризосфере корней растения-хозяина должна возникать в неблагоприятных условиях для формирования симбиоза, а также после инокуляции в связи с процессом развития его корневой системы. Очевидно, изученные нами соединения, отнесенные к негативным аллелопатическим веществам, посредством их влияния на скорость размножения *Rhizobium* имеют отношение к авторегуляции инфицирования корней бобового растения данными бактериями.

Авторы приносят благодарность сотрудникам института: Н.В. Дорофееву за предоставление семян сои, Н.Б. Митановой, Т.Е. Путилиной, А.М. Собенину за техническую помощь при проведении экспериментов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. *Peoples M.B., Craswell E.T.* // Plant and Soil. 1992. V. 141. № 1–2. P. 13–39.
2. *Makoi J.H.J.R., Ndakidemi P.A.* // Afr. J. Biotechnol. 2007. V. 6. № 12. P. 1358–1368.
3. *Gaworzewska E.T., Carlile M.J.* // J. Gen. Microbiol. 1982. V. 128. № 6. P. 1179–1188.
4. *D'Arcy-Lameta A.* // Plant and Soil. 1986. V. 92. № 1. P. 113–123.
5. *Макарова Л.Е., Латышева С.Е., Путилина Т.Е.* // Прикл. биохимия и микробиол. 2007. Т. 43. № 4. С. 429–434.
6. *Макарова Л.Е., Рудиковская Е.Г.* // Агрохимия. 2003. № 8. С. 61–65.
7. *Rynne F.G., Glenn A.R., Dilworth M.J.* // Soil Biol. Biochem. 1994. V. 26. № 6. P. 703–710.
8. *Brockwell J., Bottomley P.J., Thies J.E.* // Plant and Soil. 1995. V. 174. № 1–2. P. 143–180.
9. *Long S.R.* // Plant Physiol. 2001. V. 125. № 1. P. 69–72.
10. *Perrin D.R., Cruickshank I.A.M.* // Phytochemistry. 1969. V. 8. № 6. P. 971–978.
11. *D'Arcy-Lameta A.* // Plant and Soil. 1987. V. 101. № 1. P. 267–272.
12. *Parniske M., Schmidt P.E., Kosch K., Müller P.* // Molecular Plant-Microbe Interactions. 1994. V. 7. № 6. P. 631–638.
13. *Novak K.* // Interrelationships between Microorganisms and Plants in Soil. Czechslovakia, 1987 / Eds. V. Vančura, F. Kunc. Prague: Academia, 1989. P. 63–66.
14. *Novak K., Kropáčovà M., Havliček V., Škrdleta V.* // Folia Microbiol. 1995. V. 40. № 5. P. 535–540.
15. *Redmond J.W., Batley M., Djorjevic M.A., Innes R.W., Kuempel P.L., Rolfe B.G.* // Nature. 1986. V. 323. № 6089. P. 632–635.
16. *Peters N., Long S.R.* // Plant Physiol. 1988. V. 88. № 2. P. 396–400.
17. *Djorjevic M.A., Redmond J.W., Batley M., Rolfe B.G.* // EMBO J. 1987. V. 6. № 5. P. 1173–1179.
18. *Dacora F.D., Joseph C.M., Phillips D.A.* // Plant Physiol. 1993. V. 101. № 3. P. 819–824.
19. *Novak K., Novak K., Skrdleta V., Nemcova M., Lisa L.* // Folia Microbiologica. 1994. V. 39. № 3. P. 208–214.
20. *Richardson A.E., Djordjevic M.A., Rolfe B.G., Simpson R.J.* // Plant and Soil. 1988. V. 109. № 1. P. 37–47.
21. *Lawson C.G.R., Rolfe B.G., Djordjevic M.A.* // Austr. J. Plant Physiol. 1996. V. 23. № 1. P. 93–101.
22. *Kim S.-J., Kim S.-I., Han Y.-S.* // Corean J. Gerontol. 1997. V. 7. № 3. P. 70–76.
23. *Brack W., Altenburger R., Ensenbach U., Möder M., Segner H., Schürmann G.* // Arch. Environ. Contamination and Toxicol. 1999. V. 37. № 2. P. 164–174.
24. *Shi D.Y., Han L.J., Sun J., Wang Y., Yang Y.C., Shi J.G., Fan X.* // Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2005. V. 30. № 5. P. 347–350.
25. *Altenburger R., Brack W., Greco W.R., Grote M., Jung K., Ovari A., Riedl J., Schwab K., Küster E.* // Environ. Sci. Technol. 2006. V. 40. № 19. P. 6163–6169.
26. *Wu Z.B., Zhang S.H., Wu X.H., Cheng S.P., He F.* // Allelopathy J. 2007. V. 20. № 2. P. 327–338.

27. *Jurd L.* The Chemistry of Flavonoid Compounds / Ed. T.A. Geissman. Oxford, L., N.Y., Paris: Pergamon Press, 1962. P. 107–155.

28. *Шрайнер Р., Фьюзон Р., Кёртин Д., Моррилл Т.* Идентификация органических соединений / Ред. Б.А. Руденко. М.: Мир, 1983. 703 с.

29. *Макарова Л.Е., Латышева С.Е., Екимова Е.Г.* // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 2. С. 291–298.

30. *Наканиси К.* Инфракрасные спектры и строение органических соединений / Ред. А.А. Мальцева. М.: Мир, 1965. 216 с.

31. *Беллами Л.* Инфракрасные спектры молекул. М.: ИЛ, 1957. 444 с.

32. *Евстратова Р.И., Запесочная Г.Г.* // Химия природных соединений. 1977. № 4. С. 582.

33. *Жанаева Т.А., Кривощекова О.Е., Семенов А.А., Минаева В.Г.* // Химия природных соединений. 1989. Т. 25. № 3. С. 377.

34. *Султанходжаев М.Н., Таджибаев М.М.* // Химия природных соединений. 1976. Т. 12. № 3. С. 406.

35. *Макарова Л.Е., Соколова М.Г., Акимова Г.П., Лузова Г.Б., Нурминский В.Н.* // Агрохимия. 2004. № 12. С. 29–35.

# Role of Allelopathic Compositions in the Regulation and Development of Legume–Rhizobial Symbiosis

**L. E. Makarova[a], V. I. Smirnov[b], L. V. Klyba[b], I. G. Petrova[a], and L. V. Dudareva[a]**

[a] *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences*

[b] *Favorskii Research Institute of Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia*

*e-mail: makarova@sibir.irk.ru*

Received October 7, 2011

**Abstract**—It was discovered that aromatic compounds isolated from root exudates of three legume species (*Pisumsativum* L., *Viciafaba* L. var. *major Hartz*, and *Glycine max* L. MERR) and identified as *N*-phenyl-2-naphthyl amine, dibutyl, and dioctyl esters of orthophthalic acid, which are known to work as negative allelopathic substances, are involved in the regulation of legume–rhizobial symbiosis formation after the inoculation of roots with rhizobia under unfavorable conditions for symbiosis.