

УДК 633.358: 631.527: 581.577.2

ИЗУЧЕНИЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ – НОДУЛЯЦИИ И АЗОТФИКСАЦИИ – У РАЙОНИРОВАННЫХ СОРТОВ И ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЛИНИЙ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.) ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ РАСТЕНИЙ НА ДВУХ ФОНАХ ПИТАНИЯ АЗОТОМ

© 2013 г. Л.В. Омелянюк¹, К.К. Сидорова², В.К. Шумный²

¹ Государственное научное учреждение Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии, Омск, Россия, e-mail: milya1302@yandex.ru;

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия, e-mail: sidорова@bionet.nsc.ru.

Поступила в редакцию 24 июня 2013 г. Принята к публикации 12 августа 2013 г.

Изучены симбиотические признаки: нодуляция, азотфиксация и продуктивность у 7 районированных сортов и 3 перспективных линий гороха (*Pisum sativum* L.). Выявлены сортовые различия по признакам нодуляции и азотфиксации при выращивании на двух фонах азота. Полученные данные могут быть использованы в селекции гороха на повышение азотфиксации.

Ключевые слова: горох, *Pisum sativum* L., сорт, продуктивность, нодуляция, азотфиксация.

ВВЕДЕНИЕ

Зернобобовые культуры – горох, соя, фасоль, бобы, вика и др. – являются основным источником пищевого и кормового растительного белка. Положительная особенность бобовых культур заключается в способности вступать в симбиоз с клубеньковыми бактериями *Rhizobium leguminosarum* и фиксировать молекулярный азот из воздуха.

Клубеньковые бактерии, способные фиксировать азот, обладают ферментным комплексом «нитрогеназа», которая восстанавливает молекулярный азот до аммиачной формы. При бобово-ризобиальном симбиозе от растения-хозяина бактерии получают все необходимые элементы питания и в первую очередь углеводы, которые необходимы для роста и размножения бактерий, а также для фиксации ими азота атмосферы как источника энергии. Зерновые бобовые культуры могут за один вегетационный период фиксировать азот из воздуха в среднем

70 кг/га, а бобовые травы – 120 кг/га (Вавилов, Посыпанов, 1983).

Природные запасы азота практически не ограничены, так как атмосфера на 78 % состоит из азота. Следует отметить, что источником азота для производства азотных минеральных удобрений также служит азот воздуха. Техническая фиксация его возможна при высоких температурах 400–500 °С и давлении в несколько десятков мегапаскалей. То есть производство азотных минеральных удобрений – очень дорогой энергоемкий процесс.

Биологическая фиксация азота воздуха в микроорганизмах происходит при естественных параметрах температуры и давления. При активной азотфиксации около 30 % углеводов, синтезированных растением в процессе фотосинтеза, затрачивается клубеньками на связывание азота воздуха. До настоящего времени селекция гороха, как и других зернобобовых культур, была ориентирована только на признаки, определяющие продуктивность растения,

длину вегетационного периода, содержание белка, устойчивость к полеганию, неосыпаемость семян. По сравнению с другими бобовыми культурами (вика, фасоль, бобы, люпин и др.) у гороха лучше изучена частная генетика и селекция (Генетика и селекция гороха, 1975).

Генетика симбиотических признаков макросимбионта стала активно развиваться только с 80-х годов прошлого столетия (Jacobsen, Nijdam, 1983; Duc, Messenger, 1989; Gresshoff, 1993). В Российской Федерации по симбиогенетике гороха *Pisum sativum* L. обширные исследования ведутся в двух институтах: ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН (г. Москва) и Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск). Результаты исследований опубликованы в серии монографий и статей в журналах «Биологическая фиксация азота» (1991); «Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции» (1991); «Симбиотическая азотфиксация: генетические, селекционные и эколого-агрохимические аспекты» (2006). В ИЦиГ СО РАН создана коллекция симбиотических мутантов гороха, с использованием которой идентифицированы гены, контролирующие симбиотические признаки: устойчивость к симбиозу с клубеньковыми бактериями, неэффективные клубеньки, супернодуляция (большое количество мелких клубеньков, расположенных по всему корню), гипернодуляция (клубеньки крупные формируются в основном в средней части корня) (Сидорова, Шумный, 2003).

До недавнего времени существовало мнение о том, что у сорта нельзя одновременно повысить продуктивность растения и активность азотфиксации, так как в этих процессах используется один и тот же источник энергии – продукты фотосинтеза. Однако, как показали результаты исследований, проведенных в ИЦиГ СО РАН, сочетание в одном генотипе гороха разных аллелей разных генов – доминантного *Nod5*, контролирующего гипернодуляцию, и рецессивного *nod4*, контролирующего супернодуляцию, можно обеспечить активную азотфиксацию и хорошую продуктивность (Сидорова и др., 2010). В ИЦиГ СО РАН впервые разработан метод использования суперклубеньковых му-

тантов в селекции на повышение азотфиксации (Сидорова и др., 2012).

Цель данной работы – изучить симбиотические признаки, нодуляцию (образование корневых клубеньков) и азотфиксацию, у районированных сортов и перспективных линий гороха *Pisum sativum* L., созданных в Государственном научном учреждении Сибирском научно-исследовательском институте сельского хозяйства Россельхозакадемии, г. Омск (ГНУ СибНИИСХ).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве исходного материала были использованы 7 районированных в 10-м Западно-Сибирском регионе сортов и 3 перспективные линии гороха *Pisum sativum* L., созданных в ГНУ СибНИИСХ Россельхозакадемии.

Урожайность зерна у сортов и линий гороха изучали при выращивании на полях СибНИИСХ – в рамках конкурсного сортоиспытания по общепринятым методикам, а ИЦиГ СО РАН – в гидропонной теплице. Количество клубеньков и активность азотфиксации у растений изучали в теплице при посеве в стеллажах и в сосудах. В качестве субстрата в обоих опытах использовали керамзит.

При посеве в стеллажах применяли стандартный фон минерального питания (Чесноков, Базырина, 1957), за исключением азота, который начинали вносить в фазу полных всходов в дозе 20 % от полной нормы. Начиная с фазы «6–7-й узел стебля» дозу азота увеличивали до полной нормы. Такая схема обусловлена тем, что азот отрицательно влияет на формирование клубеньков.

При посеве в сосудах азот начинали вносить в дозе 20 % от полной нормы в фазу полных всходов. Через 10 дней после всходов дозу азота увеличивали до 40 % от полной нормы, которую наблюдали до конца опыта.

Использовали следующий состав питательной среды: основные элементы – $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; K_2SO_4 ; KH_2PO_4 ; MgSO_4 ; микроэлементы – H_3BO_3 ; MnSO_4 ; CuSO_4 ; ZnSO_4 ; $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$; FeSO_4 .

При выращивании растений в теплице, как в стеллажах, так и в сосудах, инокуляцию проводили в фазу проростков штаммом 250а

Rhizobium leguminosarum, полученным от его создателя (НИИ сельскохозяйственной микробиологии) и хорошо изученным на горохе.

Число корневых клубеньков, активность азотфиксации определяли у 10 растений каждого сорта в фазу «начало цветения» ацетиленовым методом (Hardy *et al.*, 1968) на газовом хроматографе «ЦВЕТ 500», Россия. На этих же делянках (только в стеллажах) в фазу созревания оценивали следующие признаки продуктивности: «высота растений», «число и масса семян/растение». Статистическая обработка выполнена по общепринятой методике (Доспехов, 1985).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показатели по урожайности зерна, длине вегетационного периода, содержанию белка в зерне позволяют утверждать, что созданные сорта и перспективные линии отвечают требованиям, обеспечивающим устойчивое производство зерна гороха при разных погодных условиях (табл. 1). Следует отметить показатели хорошей продуктивности этих сортов и линий в очень засушливое лето 2012 года. Наиболее продуктивными оказались районированные сорта гороха Омский 9, Омский 7, Благовест, Сибур, а также линии Л37/03 и Л38/05.

При выращивании растений гороха в стеллажах гидропонной теплицы инокуляцию проростков клубеньковыми бактериями проводили в один срок. Однако по количеству клубеньков азотфиксирующих бактерий между сортами выявлены существенные различия (табл. 2). Наибольшее число клубеньков – 511 шт./растение отмечено у сорта Омский 9. Однако по активности азотфиксации он уступал другим сортам. Самая высокая активность азотфиксации была у сортов Демос – 1210 нмоль C_2H_4 /растение/ч и у линии Л38/05 – 1029 нмоль C_2H_4 /растение/ч. В данном опыте показано, что между показателями «число клубеньков» и «активность азотфиксации» во многих случаях нет положительной корреляции.

Самая низкая азотфиксация отмечена у сортов Омский 7 – 66 нмоль C_2H_4 /растение/ч и Сибур – 47 нмоль C_2H_4 /растение/ч при достаточно высоком количестве клубеньков. Эти сорта использовали продукты фотосинтеза в основном на продукционный процесс и сформировали самое большое количество семян: сорт Омский 7 – 89,6 шт. и 14,8 г/растение, сорт Сибур – 40,5 шт. и 8,9 г/растение. И наоборот при самых низких показателях по семенной продуктивности у сортов Демос – 7,5 шт. и 1,7 г семян/растение и линии Л3805 – 7 шт. и 1,9 г семян/растение – отмечена самая высокая активность азотфикса-

Таблица 1

Характеристика сортов и перспективных линий гороха *Pisum sativum* L., СибНИИСХ, г. Омск

Сорт, линия	2011 г.			2012 г.			Содержание белка в зерне, %
	Урожайность зерна		Вегетационный период, сут	Урожайность зерна		Вегетационный период, сут	
	т/га	± к St		т/га	± к St		
Омский 9, стандарт	2,58	–	76	1,91	–	55	21,3
Омский 7	2,43	–0,15	75	2,21	0,30	56	20,4
Демос	2,27	–0,31	75	1,81	–0,10	56	21,3
Благовест	2,65	0,07	77	2,39	0,48	56	19,5
Бонус	1,45	–1,13	74	1,83	–0,08	56	21,1
Сибур	2,27	–0,31	80	2,05	0,14	56	21,2
Зауральский 3	2,51	–0,07	79	1,92	0,01	56	19,5
Л 37/03	2,59	0,01	71	2,50	0,59	56	20,9
Л 32/05	2,86	0,28	80	2,08	0,17	57	21,7
Л 38/05	2,54	–0,04	78	2,15	0,24	57	19,0
	НСР ₀₅	0,45		НСР ₀₅	0,24		

Таблица 2
Симбиотические признаки и продуктивность у сортов и линий гороха при выращивании растений в стеллажах

Сорт, линия	Высота, фаза начала цветения		Корневые клубеньки		Активность нитрогеназы		Высота, фаза полного созревания		Семена		Масса семян	
	см	± к St	шт./растение	± к St	нмоль C ₂ H ₄ /растение/ч	± к St	см	± к St	шт./растение	± к St	г/растение	± к St
Омский 9, стандарт	152,2	0,0	511,4	0,0	127,0	0,0	194,2	0,0	20,2	0,0	5,2	0,0
Омский 7	152,6	0,4	335,0	-176,4	66,1	-60,9	267,5	73,3	89,6	69,4	14,8	9,6
Демос	65,0	-87,2	211,4	-300,0	1210,7	1083,7	70,7	-123,5	7,5	-12,7	1,7	-3,5
Благовест	96,0	-56,2	188,8	-322,6	654,2	527,2	166,1	-28,1	18,0	-2,2	5,3	0,1
Бонус	76,4	-75,8	294,0	-217,4	361,4	234,4	88,9	-105,3	11,1	-9,1	2,9	-2,3
Сибур	144,8	-7,4	333,2	-178,2	46,8	-80,2	244,8	50,6	40,5	20,3	8,9	3,7
Зауральский 3	117,4	-34,8	251,6	-259,8	522,5	395,5	155,3	-38,9	26,1	5,9	4,0	-1,2
Л 37/03	121,0	-31,2	288,8	-222,6	307,5	180,5	190,6	-3,6	27,3	7,1	5,2	0,0
Л 32/05	137,4	-14,8	207,2	-304,2	277,5	150,5	253,1	58,9	19,5	-0,7	4,8	-0,4
Л 38/05	67,6	-84,6	271,2	-240,2	1028,7	901,7	80,9	-113,3	7,0	-13,2	1,6	-3,6
	HCP ₀₅	11,5	HCP ₀₅	112,1	HCP ₀₅	384,7	HCP ₀₅	21,9	HCP ₀₅	12,2	HCP ₀₅	2,3

Таблица 3

Симбиотические признаки – нодуляция и активность азотфиксации – у сортов и линий гороха при выращивании растений в сосудах

Сорт, линия	Высота, фаза «начало цветения»		Корневые клубеньки		Активность нитрогеназы	
	см	± к St	шт./растение	± к St	нмоль C ₂ H ₄ /растение/ч	± к St
Омский 9 St	96,9	0,0	311,3	0,0	7618	0,0
Омский 7	113,0	16,1	317,4	6,1	3388	-4230
Демос	41,5	-55,4	193,6	-117,7	6536	-1082
Благовест	81,6	-15,3	130,8	-180,5	2843	-4775
Бонус	47,5	-49,4	246,3	-65,0	4836	-2782
Сибур	103,3	6,4	222,5	-88,8	7506	-112
Л 32/05	111,5	14,6	137,8	-173,5	6286	-1332
Л 38/05	49,9	-47,0	195,3	-116,0	2527	-5091
	НСР	6,2	НСР	90,1	НСР	1210

ции соответственно 1211 и 1029 нмоль C₂H₄/растение/ч.

Следует отметить, что такие закономерности в сортовых различиях по симбиотическим признакам выявлены в контролируемых условиях выращивания растений на фоне полной нормы азота.

При выращивании растений в сосудах, где доза азота была низкой в течение длительного периода роста растений (до фазы «начало цветения»), получены следующие результаты (табл. 3). Самая сильная нодуляция была у сортов Омский 9 и Омский 7. Количество клубеньков на 1 растение соответственно по сортам было: 311,3 и 317,4 шт./растение. При почти одинаковой нодуляции оба сорта показали разную активность азотфиксации. У сорта Омский 9 она составила 7618 нмоль C₂H₄/растение/ч, а у сорта Омский 7 – 3388 нмоль C₂H₄/растение/ч.

При выращивании растений при низкой дозе азота у всех сортов активность азотфиксации была значительно выше, чем на фоне полной нормы азота (табл. 2).

При изучении симбиотических признаков, нодуляции и азотфиксации, у разных сортов гороха выявлены существенные сортовые различия по этим признакам, а также установлено влияние дозы азота на образование клубеньков и активность азотфиксации. Количество корневых клубеньков не всегда коррелирует с показателем активности азотфиксации.

При малых дозах азота растение переходит на симбиотрофный тип питания азотом, активность азотфиксации существенно повышается. При полной или повышенной дозе азота активность азотфиксации снижается. В ближайшей перспективе в некоторые сорта будет введен ген супернодуляции для повышения активности азотфиксации.

Работа частично финансировалась по программе «Разработка новых биологических методов и селекции бобовых на повышение биологической фиксации азота».

ЛИТЕРАТУРА

- Биологическая фиксация азота / Отв. ред. В.К. Шумный, К.К. Сидорова. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. 270 с.
- Вавилов П.П., Посыпанов Г.С. Бобовые культуры и проблема растительного белка. М.: Россельхозиздат, 1983. 255 с.
- Генетика и селекция гороха / Отв. ред. В.В. Хвостова. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1975. 367 с.
- Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции / Под ред. И.А. Тихоновича, Н.А. Проворова. СПб.: Наука, 1998. 194 с.
- Доспехов В.А. Методика полевого опыта. М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
- Сидорова К.К., Гончарова А.В., Гончаров П.Л., Шумный В.К. Селекция кормового гороха (*Pisum sativum* L.) на повышение азотфиксации с использованием симбиотических мутантов // С.-х. биология. 2012. № 1. С. 105–109.

- Сидорова К.К., Шумный В.К. Создание и генетическое изучение коллекции симбиотических мутантов гороха (*Pisum sativum* L.) // *Генетика*. 2003. Т. 39. № 4. С. 501–509.
- Сидорова К.К., Шумный В.К., Власова Е.Ю. и др. Симбиогенетика и селекция макросимбионта на повышение азотфиксации на примере гороха (*Pisum sativum* L.) // *Информ. вестник ВОГиС*. 2010. Т. 14. № 2. С. 357–374.
- Сидорова К.К., Шумный В.К., Назарюк В.М. Симбиотическая азотфиксация: генетические, селекционные и эколого-агрехимические аспекты. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», ИЦиГ СОРАН, 2006. 134 с.
- Чесноков В.А., Базырина Е.Н. Выращивание растений без почвы на искусственных средах // *Вестник с.-х. науки*. 1957. № 4. С. 121–128.
- Duc G., Messenger A. Mutagenesis of pea (*Pisum sativum* L.) and isolation of mutants for nodulation and nitrogen fixation // *Plant Sci*. 1989. V. 60. P. 207–213.
- Gresshoff P.M. Molecular genetic analyses of nodulation genes in soybean // *Plant Breed. Rev*. 1993. V. 11. P. 275–318.
- Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation: laboratory and field evaluation // *Plant Physiol*. 1968. V. 43. No. 8. P. 1185–1207.
- Jacobsen E., Nijdam H.A. A mutant showing efficient nodulation in the presence of nitrate // *Pisum Newslett*. 1983. V. 15. P. 31–32.

STUDY OF NODULATION AND NITROGEN FIXATION IN INTRODUCED CULTIVARS AND CANDIDATE LINES OF PEA (*PISUM SATIVUM* L.) GROWN AT TWO NITROGENOUS NUTRITION LEVELS

L.V. Omel'yanuk¹, K.K. Sidorova², V.K. Shumny²

¹ Siberian Research Institute of Agriculture, Russian Academy of Agricultural Sciences, Omsk, Russia, e-mail: milya1302@yandex.ru;

² Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: sidorova@bionet.nsc.ru.

Summary

Symbiotic traits – nodulation, nitrogen fixation, and performance – have been studied in seven introduced cultivars and three candidate lines of pea (*Pisum sativum* L.) The cultivars grown at two nitrogen nutrition levels differ in traits associated with nodulation and nitrogen fixation. The results can be utilized in pea breeding for nitrogen fixation.

Key words: pea, *Pisum sativum* L., cultivar, performance, nodulation, nitrogen fixation.