

УДК 635.656:631.559.2:631.522/.524:581.138.1

СЕЛЕКЦИЯ КОРМОВОГО ГОРОХА (*Pisum sativum* L.) НА ПОВЫШЕНИЕ АЗОТФИКСАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИМБИОТИЧЕСКИХ МУТАНТОВ

К.К. СИДОРОВА¹, А.В. ГОНЧАРОВА², П.Л. ГОНЧАРОВ², В.К. ШУМНЫЙ¹

Разработана технология использования суперклубеньковых мутантов в селекции гороха на повышение эффективности симбиоза. Метод основан на взаимодействии в одном генотипе рецессивных и доминантных аллелей разных суп-генов — *nod4* и *Nod5*, контролирующих супер- и гипернодуляцию. Доказана возможность одновременно вести селекцию на повышение азотфиксации и продуктивности макросимбионта.

Ключевые слова: горох, сорт, суперклубеньковый мутант, азотфиксация, рекуррентный отбор, продуктивность.

Keywords: *Pisum sativum*, cultivar, supernodulating mutant, nitrogen fixation, recurrent selection, productivity.

Горох — основная зернобобовая культура в нашей стране, широко используется в качестве источника пищевого и кормового растительного белка. Как и другие бобовые, она обладает уникальной способностью вступать в симбиоз с клубеньковыми бактериями и фиксировать молекулярный азот из атмосферы, восстанавливая его до аммония. В системе бобово-ризобияльного симбиоза растение выполняет роль источника энергии, расходуя продукты фотосинтеза как для собственного развития, так и для роста корневых клубеньков и азотфиксации.

Долгое время селекция гороха была ориентирована на улучшение признаков надземных органов (стебеля, листьев, цветков, бобов, семян), сокращение продолжительности вегетационного периода, повышение содержания белка и т.д. Генетика симбиотических признаков стала развиваться только с 1980-х годов (1-4), в настоящее время исследования генетических, селекционных и эколого-агробиохимических аспектов симбиотической азотфиксации активно продолжаются (5-11).

Результаты изучения мутантов гороха показали, что в их геноме присутствует достаточно много генов, контролирующих симбиотические признаки — нодуляцию и азотфиксацию. Сделано заключение о том, что макросимбионт играет ключевую роль в генетическом контроле симбиотической азотфиксации, так как контролирует способность растения к симбиозу с клубеньковыми бактериями *Rhizobium*, число корневых клубеньков и их эффективность, активность азотфиксации, определяемую по активности фермента нитрогеназы, продолжительность периода активной азотфиксации. При этом не исключается влияние разных штаммов клубеньковых бактерий на эффективность симбиоза (12).

Суперклубеньковые мутанты, которые характеризуются повышенной нодуляцией и активной азотфиксацией, безусловно, заслуживают внимания с точки зрения селекции. Недостаток таких мутантов — низкая продуктивность. В опытах иностранных исследователей урожай зерна у суперклубеньковых мутантов сои оказался в среднем на 25 % ниже, чем у сортов с нормальной нодуляцией, однако положительное влияние суперклубеньковых генотипов сои на последующие культуры в севообороте (овес и ячмень) было значительно выше (13).

Нами созданы семь мутантных линий с супернодуляцией, у которых идентифицированы *nod*-гены и установлена их хромосомная локали-

зация. Ранее в полевых условиях и в теплице были проведены опыты по изучению экспрессии генов супернодуляции *nod4* и *nod3* в зависимости от генотипической среды, показана возможность использования суперклубеньковых мутантов в качестве доноров в селекции гороха на повышение азотфиксации (10). Установлено, что гипернодуляция контролируется доминантным геном *Nod5*, который расположен в 3-й группе сцепления (14, 15).

Целью настоящей работы была разработка технологии использования симбиотических гипер- и суперклубеньковых мутантов в селекции гороха на повышение азотфиксации.

Методика. Исследования проводили в полевых условиях и в вегетационных опытах (теплица) (2003-2011 годы, Новосибирская обл.). Объектами экспериментов служили два сорта кормового гороха — Дружная и Новосибирская 1; в качестве донора улучшенных симбиотических признаков использовали мутант К301, индуцированный из сорта посевного гороха Рамонский 77. В теплице растения выращивали на стандартном фоне минерального питания (в начальный период роста азот вносили в количестве 20 % от полной нормы). Инокуляцию штаммом 250a *Rhizobium leguminosarum* (получен из коллекции Всероссийского НИИ сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург—Пушкин) осуществляли в фазу проростков.

По каждому сорту проводили реципрокные скрещивания с суперклубеньковым мутантом. Растения с супернодуляцией выделяли в F₂, убирали индивидуально и создавали на их основе отдельные линии. В поколениях F₃-F₇ проводили рекуррентный отбор продуктивных линий с супернодуляцией. В F₇ по каждому сорту осуществляли отбор индивидуальных линий и индивидуально-групповой отбор линий с учетом продуктивности и эффективности азотфиксации (11).

Число корневых клубеньков и активность азотфиксации определяли у 10-15 растений в каждой линии в фазу начала цветения ацетиленовым методом (16) на газовом хроматографе Цвет 500 (Россия). На этих же делянках в фазу созревания у 10-15 растений оценивали следующие признаки продуктивности: высоту растений, число бобов, число и массу семян, длину вегетационного периода.

Определение корневой биомассы и содержания в ней азота выполняли по общепринятой методике (расчет при густоте стояния растений 1,8 млн/га).

Статистическую обработку проводили по Б.А. Доспехову (17).

Результаты. Используемые в эксперименте сорта кормового гороха Дружная и Новосибирская 1 созданы К.К. Сидоровой, А.В. Гончаровой, П.Л. Гончаровым и др. Сорта дают высокий урожай зеленой массы и зерна, относятся к гиперклубеньковым и маркированы геном *Nod5*. Клубеньки крупные, формируются в основном в верхней части корня. Активность азотфиксации выше средних показателей для сортов с гипернодуляцией. Мутант К301 характеризуется сильной нодуляцией. Его клубеньки мелкие и формируются по всему корню в течение более длительного периода времени, чем у растений сортов Дружная и Новосибирская 1. Исследования показали, что у К301 в генотипе имеется рецессивная мутация, обозначенная нами как *nod4*. Ген расположен в 5-й группе сцепления (18).

Поскольку супернодуляция — признак рецессивный, то растения с измененным типом корня выделяли в F₂. В следующих поколениях расщепление по типу корня не происходило. В F₃-F₇ поколениях рекуррентных линий основным механизмом формообразовательного процесса был рекомбиногенез.

По высоте растений и семенной продуктивности суперклубеньковый мутант существенно уступал сорту Дружная и полученным от него ре-

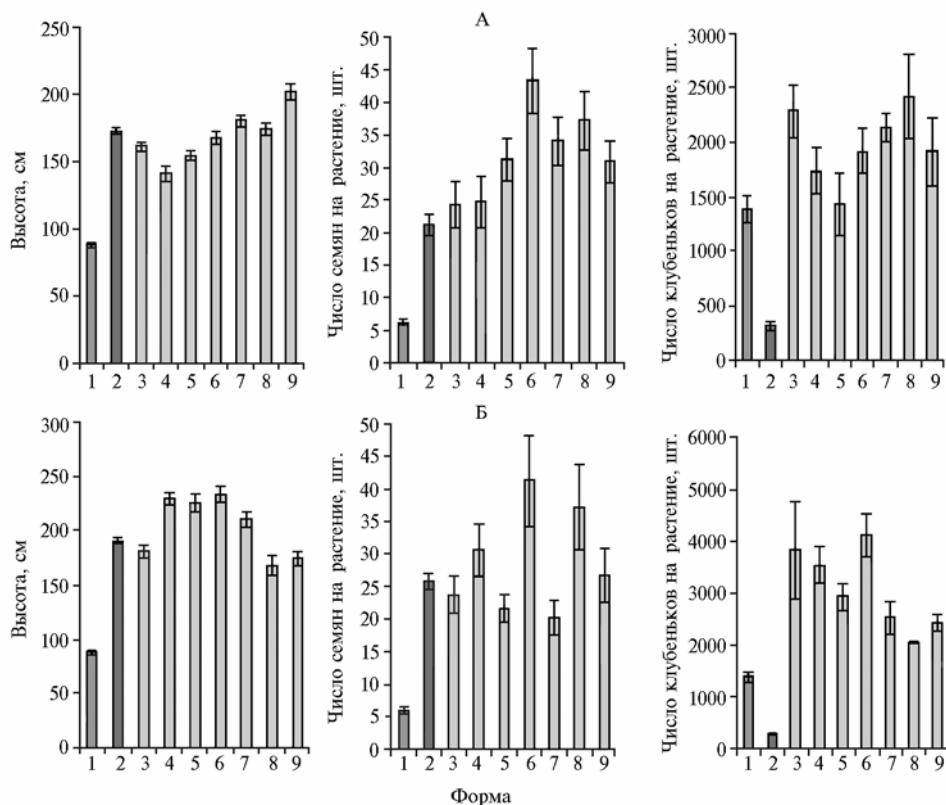


Рис. 1. Высота растения, число семян и клубеньков на одно растение у гороха *Pisum sativum* L. кормовых сортов Дружная (А), Новосибирская 1 (Б) и их рекуррентных линий от скрещивания с суперклубеньковым мутантом К301, индуцированным из сорта Рамонский 77: 1 — мутант, 2 — скрещиваемый сорт, 3-9 — рекуррентные линии F₆, полученные от скрещивания мутанта и соответствующего сорта (полевой опыт, Новосибирская обл., 2009 год).

куррентным линиям (рис. 1, А). Последние, в свою очередь, имели сходные или большие по сравнению с сортом показатели.

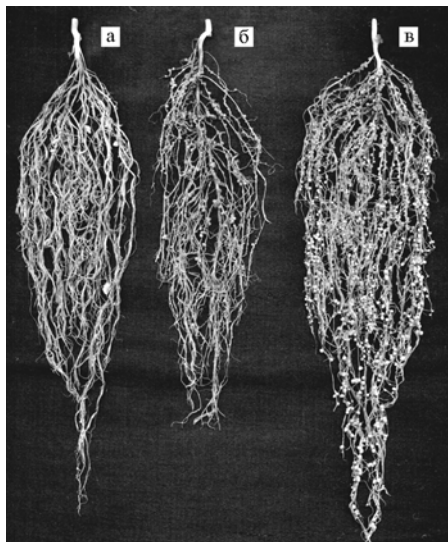


Рис. 2. Корни у растений гороха *Pisum sativum* L. кормового сорта Новосибирская 1 (*Nod5*) (а), суперклубенькового мутанта К301 (*nod4*) (б) и рекуррентной линии К727а ультрасупер (*nod4 Nod5*) (в) (теплица, 2008 год).

Аналогичные результаты получены в опытах с сортом Новосибирская 1 (см. рис. 1, Б). Следует отметить, что этот сорт гороха высокорослый. Его растения были более чем в 2 раза выше растений суперклубенькового мутанта. Среди рекуррентных линий мы выделили одну более высокорослую по сравнению с сортом и три, имевших показатели, сходные с Новосибирской 1. Три линии обладали повышенной семенной продуктивностью.

Все рекуррентные линии характеризовались очень сильной нодуляци-

ей: число азотфиксирующих клубеньков на корнях у этих растений было

Активность азотфиксации у форм кормового гороха *Pisum sativum* L. (теплица, 2008 год)

Мутант, сорт, рекуррентная линия	Активность нитрогеназы, нмоль C ₂ H ₄ /(растение · ч) ⁻¹
Суперклубеньковый мутант К301	1242
Сорт Дружная	424
Сорт Новосибирская1	463
К301 × сорт Дружная	1123-1226
Сорт Дружная × К301	2312-2380
К301 × сорт Новосибирская1	1235-2107
Сорт Новосибирская1 × К301	2399-2702

значительно больше, чем у сортов и суперклубенькового мутанта (рис. 2). По интенсивности азотфиксации все рекуррентные линии превосходили сорта (табл.).

До недавнего времени существовало мнение, что у сорта нельзя одновременно повысить продуктивность и активность азотфиксации, по-

скольку в этих процессах используется один и тот же источник энергии — продукты фотосинтеза. Наши результаты свидетельствуют об обратном.

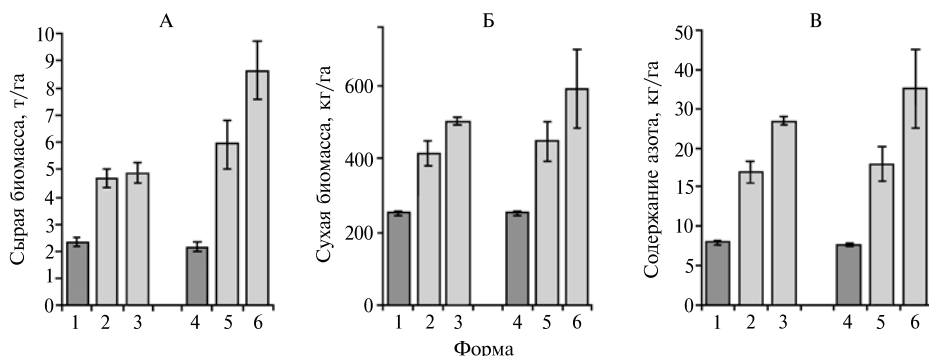


Рис. 3. Накопление сырой (А) и сухой (Б) биомассы корней, а также содержание в них азота (В) у растений гороха *Pisum sativum* L. кормовых сортов и их рекуррентных линий от скрещивания с суперклубеньковым мутантом К301, индуцированным из сорта Рамонский 77: 1 — сорт Дружная; 2, 3 — рекуррентные линии, полученные от сорта Дружная; 4 — сорт Новосибирская 1; 5, 6 — рекуррентные линии, полученные от сорта Новосибирская 1 (теплица, 2009 год).

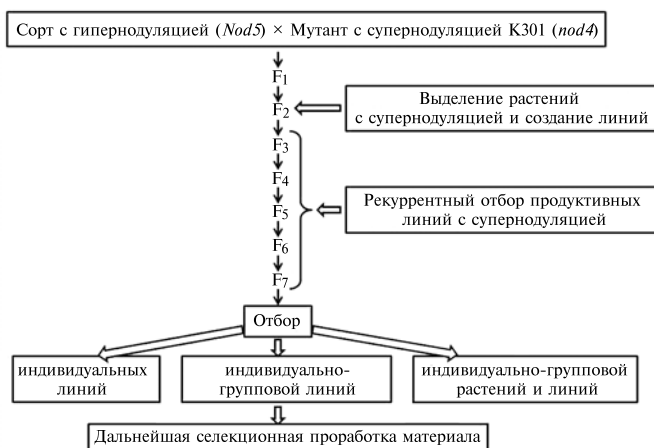


Рис. 4. Предлагаемая схема селекции гороха на повышение азотфиксации с использованием симбиотических мутантов.

Бобовые — хороший предшественник для последующих культур. Созданные нами рекуррентные линии по количеству вегетативной биомассы корней и содержанию в них азота значительно превосходили райониро-

ванные сорта Дружная и Новосибирская 1 (рис. 3).

На основании результатов многолетних исследований по симбиогенетике и селекции гороха нами разработана схема селекционного процесса на повышение азотфиксации (рис. 4).

Таким образом, комбинация доминантных и рецессивных аллелей разных симбиотических генов дает возможность получать формы, не уступающие промышленным сортам по продуктивности, но значительно пре-

восходящие их по накоплению в почве корневой биомассы с высоким содержанием в ней азота. Это позволит с помощью генетико-селекционных методов обеспечивать растения азотом через симбиотический комплекс, что исключительно важно с точки зрения экологии и энергосбережения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jacobsen E., Nijdam H.A. A mutant showing efficient nodulation in the presence of nitrate. *Pisum Newslet.*, 1983, 15: 31-32.
2. Kneen B.E., LaRue T.A. Induced symbiosis mutants of pea (*Pisum sativum*) and sweet clover (*Melilotus alba annual*). *Plant Sci.*, 1988, 58: 177-182.
3. Duc G., Messenger A. Mutagenesis of pea (*Pisum sativum* L.) and the isolation of mutants for nodulation and nitrogen fixation. *Plant Sci.*, 1989, 60: 207-213.
4. Gresshoff P.M. Molecular genetic analyses of nodulation genes in soybean. *Plant Breed. Rev.*, 1993, 11: 275-318.
5. Сидорова К.К., Столярова С.Н., Катышева В.Б. Азотфиксирующая активность у мутантов гороха. *Генетика*, 1987, 23(7): 1218-1221.
6. Сидорова К.К., Ужинцева Л.П. Использование мутантов для выявления генов, контролирующих симбиотические признаки у гороха. *Генетика*, 1992, 28(4): 144-151.
7. Сидорова К.К., Шумный В.К. Исследование суперклубеньковых мутантов гороха (*Pisum sativum* L.). *Генетика*, 1998, 34(10): 1452-1454.
8. Сидорова К.К., Шумный В.К. Создание и генетическое изучение коллекции симбиотических мутантов гороха (*Pisum sativum* L.). *Генетика*, 2003, 39(4): 501-509.
9. Сидорова К.К., Назарюк В.М., Кленова М.И. Способ оценки азотфиксирующей способности бобовых культур. Патент Ru 2195104. Заявл. 15.04.2001. Опубл. 27.12.2002. Бюл. № 36.
10. Сидорова К.К., Шумный В.К., Назарюк В.М. Симбиотическая азотфиксация: генетические, селекционные и эколого-агрохимические аспекты. Новосибирск, 2006.
11. Сидорова К.К., Гончарова А.В., Гончаров П.Л., Шумный В.К. Разработка генетических и селекционных основ симбиотической азотфиксации. Мат. V съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. М., 2009, ч. II: 216.
12. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Сельскохозяйственная микробиология как основа экологически устойчивого агропроизводства: фундаментальные и прикладные аспекты. С.-х. биол., 2011, 3: 3-9.
13. Bhatia C.R., Nichterlein K., Maluszynski M. Mutations affecting nodulation in grain legumes and their potential in sustainable cropping systems. *Euphytica*, 2001, 120: 415-432.
14. Сидорова К.К., Шумный В.К. Новый ген гороха (*Pisum sativum* L.) *Nod5-nod5*, контролирующей нодуляцию. Докл. РАН, 1997, 353(5): 703-704.
15. Сидорова К.К., Шумный В.К., Мищенко Т.М. Хромосомная локализация гена *Nod5*, контролирующего нодуляцию у гороха. Докл. РАН, 1999, 367(6): 851-852.
16. Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. The acetylene—ethylene assay for N₂-fixation: laboratory and field evolution. *Plant Physiol.*, 1968, 43(8): 1185-1207.
17. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М., 1985.
18. Сидорова К.К., Ужинцева Л.П. Локализация мутантного гена *nod4*, контролирующего супернодуляцию у гороха. Докл. РАН, 1994, 336(6): 847-849.

1 Учреждение Российской академии наук
Институт цитологии и генетики СО РАН,
630090 г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10,
e-mail: sidorova@bionet.nsc.ru, shumny@bionet.nsc.ru;

2 ГНУ Сибирский НИИ растениеводства
и селекции Россельхозакадемии,
630501 Новосибирская обл., Новосибирский р-н, пос. Краснообск,
e-mail: sibniirs@bk.ru

Поступила в редакцию
20 июня 2011 года

SELECTION OF PEA ON RISING OF NITROGEN FIXATION WITH THE USE OF SYMBIOTIC MUTANTS

K.K. Sidorova¹, A.V. Goncharova², P.L. Goncharov², V.K. Shumnyi¹

S u m m a r y

The technology was developed for use of supernodulating mutants in pea selection for rising symbiosis efficiency. The method is based on interaction within one genotype of both recessive and dominant alleles of different sym-genes — *nod4* and *Nod 5*, control the super- and hypernodulation. The possibility was established for simultaneous selection on rising of nitrogen fixation and productivity of macrosymbiont.