

СИМБИОГЕНЕТИКА И СЕЛЕКЦИЯ МАКРОСИМБИОНТА НА ПОВЫШЕНИЕ АЗОТФИКСАЦИИ НА ПРИМЕРЕ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.)

К.К. Сидорова, В.К. Шумный, Е.Ю. Власова, М.Н. Глянченко,
Т.М. Мищенко, Г.Г. Майстренко

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: sidорова@bionet.nsc.ru

В статье представлены результаты многолетних экспериментальных исследований по симбиогенетике и селекции макросимбионта в системе бобово-ризобиального симбиоза на примере гороха (*Pisum sativum* L.). Создана и генетически изучена коллекция симбиотических мутантов гороха. Идентифицированы и локализованы на хромосомной карте *Pisum* новые симбиотические гены. Впервые на горохе индуцированы доминантные симбиотические мутанты, характеризующиеся хорошей продуктивностью и активной азотфиксацией. Изучены физиологические особенности симбиотических мутантов по содержанию фитогормонов ауксина и гиббереллина. Выявлены различия по активности азотфиксации у разных мутантов в течение онтогенеза. Выделены формы с продолжительным периодом активной азотфиксации. Предложен новый способ определения эффективности бобово-ризобиального симбиоза. Впервые разработан метод использования симбиотических мутантов в селекции на повышение эффективности азотфиксации. Метод основан на взаимодействии в одном генотипе разных *symb* генов. Создана серия продуктивных константных рекуррентных линий седьмого поколения, превышающих по нодуляции и активности азотфиксации коммерческие сорта гороха. Линии отличаются накоплением большой биомассы корней с повышенным содержанием в них азота. Это позволит использовать их в сельскохозяйственном производстве вместо дорогостоящих органических и минеральных удобрений.

Ключевые слова: симбиогенетика, макросимбионт, горох, нодуляция, азотфиксация, селекция.

Бобово-ризобиальный симбиоз

Симбиоз был впервые определен как совместное существование организмов, принадлежащих к разным видам. Согласно более современному определению, симбиоз – это «ассоциация между особями разных видов, сохраняющаяся в течение значительной части жизненного цикла» (Маргелис, 1983. С. 144).

Симбиоз, полезный для обоих партнеров, называется мутуализмом; симбиоз, безвредный для обоих партнеров, получил наименование комменсализма, или форезии; в ассоциациях с вредными последствиями для компонентов симбиоза речь идет о паразитизме и патогенности.

Симбиогенез играет важную роль в эволюции. Согласно утверждению основоположника симбиогенеза К.С. Мережковского, только

единственное царство – прокариотов – не является результатом симбиоза, а представляет собой непосредственное развитие первоначально появившихся организмов в лице первичных бактерий. Остальные два царства, растительное и животное, являются результатом симбиоза; животное – результатом простого симбиоза, а растительное – двойного симбиоза. К настоящему времени доказано симбиотическое происхождение митохондрий и пластид (Захаров, 2009).

Наиболее важным для фундаментальных и прикладных исследований является бобово-ризобиальный симбиоз. В 1835 г. французский ученый Ж.-Б. Бусенго установил, что бобовые культуры способны усваивать азот из воздуха. Через полвека, в 1886 г., немецкий ученый Г. Гельригель выяснил, что усвоение азота воздуха у бобовых культур осуществляется только

в симбиозе с клубеньковыми бактериями. 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. Человеку и животным азот нужен в виде белков животного и растительного происхождения, растениям – в виде солей азотной кислоты или ионов аммония. Азот является первым из основных элементов питания растений. Однако селитра в виде залежей встречается в природе очень редко, и запасы ее невелики. Источником азота для азотных минеральных удобрений 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. Уникальной способностью фиксировать азот не обладают ни животные, ни высшие растения. При инфицировании бактерией корневой системы растения-хозяина принято рассматривать несколько стадий. Первая – приближение микробной клетки к растению в ответ на узнавание химических продуктов, выделяемых из корней растения. Этот процесс называется хемотаксисом. Вторая стадия – контактное взаимодействие микроорганизма с растением. В этот период происходит лектин-углеводное узнавание растения микроорганизмом. Лектин корневых волосков растений – углеводузнающий белок. Он узнает углевод поверхности бактерий и прочно связывается с ним.

Все микроорганизмы, в том числе и клубеньковые бактерии, которые способны фиксировать азот, обладают специфическим ферментным комплексом, который называется «нитрогеназа», восстанавливающим молекулярный азот. 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.

По данным Вавилова и Посыпанова (1983), для фиксации одной молекулы азота воздуха затрачивается 15 молекул аденозинтрифосфата – АТФ; по данным Игнатова (1998) – 25–35 молекул. На каждый миллиграмм фиксированного азота растение расходует 10,3 мг углеводов.

При активной азотфиксации около 30 % углеводов, синтезированных растением в процессе фотосинтеза, затрачивается клубеньками на связывание азота воздуха (Вавилов, Посыпанов, 1983).

Леггемоглобин – красный пигмент клубеньков, который аналогичен гемоглобину крови человека и животных по строению и функции, поскольку переносит кислород воздуха. Симбиотическая фиксация азота – аэробный процесс. Кислород связывается леггемоглобином и используется в процессе окисления углеводов с высвобождением энергии для фиксации азота. На 1 мл фиксированного азота воздуха потребляется 3 мл кислорода. Поэтому клубеньки на корнях растений образуются в наиболее аэрируемом слое почвы (0–10 см). Хорошим индикатором активности симбиоза служит красная окраска клубеньков, что свидетельствует о наличии в клубеньках леггемоглобина.

Наиболее интенсивно фиксация азота воздуха протекает при температуре 20 °С; 10 °С считаются нижним порогом азотфиксации, хотя клубеньки образуются и при более низкой температуре. Низкая температура влияет главным образом на развитие бобового растения, приводя к снижению обеспеченности клубеньков углеводами. Сами по себе клубеньковые бактерии в меньшей степени реагируют на колебания температуры.

Все клубеньковые бактерии, вступающие в симбиоз с бобовыми культурами, относятся к роду *Rhizobium*. По классификации Л.М. Доросинского (1970), этот род делится на 11 видов. Каждый вид способен инфицировать одну или несколько бобовых культур. Основные из них: *Rhizobium leguminosarum* – горох, вика, кормовые бобы, чина, чечевица; *Rh. phaseoli* – фасоль; *Rh. japonicum* – соя; *Rh. trifolii* – клевер; *Rh. meliloti* – люцерна, донник; *Rh. lupine* – люпин; *Rh. simplex* – эспарцет; *Rh. cicer* – нут.

Для обеспечения эффективного развития сельского хозяйства и сохранения окружающей среды необходимо проведение исследований,

целью которых является повышение фиксации биологического азота. В решении проблемы экологически чистого и дешевого биологического азота важная роль принадлежит бобово-ризобиальному симбиозу.

Основной зернобобовой культурой в России и других странах является горох (*Pisum sativum* L.), который используется как источник пищевого и кормового растительного белка. Общая площадь посевов гороха в Российской Федерации превышает 800 тыс. га, а собираемый урожай – 1,5 млн тонн в год. По производству гороха Россия занимает третье место в мире (<http://faostat.fao.org>).

Долгое время генетика и селекция гороха были ориентированы только на надземные признаки стебля, листьев, цветков, бобов, семян, вегетационного периода и др. Генетика симбиотических признаков макросимбионта стала приоритетным научным направлением только с 80-х годов прошлого столетия (Jacobsen, Nijdam, 1983; Kneen, La Rue, 1988; Duc, Messenger, 1989; Gresshoff, 1993; Sagan *et al.*, 1994). С этого же времени активные исследования по генетике симбиотической азотфиксации на горохе ведутся в Институте цитологии и генетики СО РАН в Новосибирске (Сидорова и др., 1987; Сидорова, Ужинцева, 1992, 1994; Sidorova, Uzhintseva, 1995; Сидорова, Шумный, 1998, 1999; Sidorova *et al.*, 1999; Сидорова и др., 2006, 2009).

Феногенетика симбиотических мутантов

Для выявления симбиотических генов была создана и генетически изучена коллекция симбиотических мутантов гороха (Сидорова, Шумный, 2003).

Результаты исследований показали, что в геноме *Pisum* достаточно много генов, контролирующих симбиотические признаки – нодуляцию и азотфиксацию. Выделено семь основных групп симбиотических мутантов: 1 – бесклубеньковые (*nod-*), т. е. устойчивые к симбиозу; 2 – клубеньков нет или они малочисленные (*nod+/-*); 3 – неэффективные клубеньки (*nod+fix-*); 4 – слабоэффективные клубеньки; 5 – число клубеньков и активность азотфиксации сильно варьируют; 6 – с повышенным количеством крупных клубеньков (гипернодуляция) и повышенной азотфиксацией; 7 – суперклубеньковые,

с огромным количеством мелких клубеньков, активной азотфиксацией и высокой устойчивостью к нитратам (*nod++fix++*).

Известные в настоящее время симбиотические гены у гороха установлены в основном с использованием индуцированных мутантов. В рамках программы по выявлению *sym* генов нами проведены обширные скрещивания симбиотических мутантов с исходными сортами, а также фенотипически сходных мутантов на аллелизм с привлечением в исследования симбиотических мутантов из американской коллекции, маркированных разными *sym* генами.

Большинство индуцированных симбиотических мутантов имеют рецессивный тип наследования. Нами впервые были получены симбиотические мутанты с доминантным наследованием. Все они входили в группу мутантов с гипернодуляцией (Sidorova *et al.*, 2001; Сидорова и др., 2009).

Бесклубеньковые мутанты *sym5* и *sym8* скрещивали с бесклубеньковыми мутантами нашей коллекции: K1005м, K14а, K20а. Установлено, что мутант K20а и мутант *sym5* аллельны. При скрещивании мутантов K287а, K19а с неэффективными клубеньками и *sym13* аллельные формы не выявлены. С использованием суперклубенькового мутанта K301, индуцированного из сорта Рамонский 77, нами идентифицирован и локализован на хромосомной карте гороха новый ген *Nod4-nod4*, рецессивный аллель которого контролирует супернодуляцию (Сидорова, Ужинцева, 1994).

При скрещивании трех суперклубеньковых мутантов K10а, K11а, K12а, индуцированных из сорта Рондо, установлено, что все они аллельны по мутантному гену, определяющему супернодуляцию. Эти же мутанты оказались аллельными с суперклубеньковым мутантом *nod3* из американской коллекции. Следует отметить, что наши суперклубеньковые мутанты были индуцированы на 4 года раньше, чем мы получили мутант *nod3* из США. Сделано заключение, что мутанты K10а, K11а, K12а представляют собой новый аллель гена *nod3*, контролирующего супернодуляцию.

Два других суперклубеньковых мутанта, K21а и K22а, аллельны между собой, но не аллельны с мутантами *nod3* и *nod4*. Мутация обозначена символом *nod6* (Sidorova *et al.*, 2003).

Кроме мутантов для идентификации симбиотических генов нами были использованы чистые линии, созданные на основе сортов гороха Торсдаг и Рамонский 77, которые контрастно различаются по нодуляции, азотфиксации и устойчивости к нитратам. В результате был идентифицирован и локализован на хромосомной карте новый ген *Nod5-nod5*, который в доминантном состоянии контролирует обильную нодуляцию, высокую азотфиксацию, устойчивость к нитратам и, что особенно важно, не вызывает снижения продуктивности растений (Сидорова, Шумный, 1997; Сидорова и др., 1999).

При изучении симбиотических мутантов определенным научным интересом представляют реципрокные прививки по типу «корень/стебель» и «стебель/корень». Опыты с прививками на суперклубеньковых мутантах гороха показали, что не у всех суперклубеньковых форм нодуляция контролируется стеблем. У трех мутантов, К301, К21а, К22а, нодуляция контролируется стеблем, у мутантов К10а, К11а, К12а – корнем. Контроль нодуляции со стороны корня установлен также у мутанта *nod3* из американской коллекции мутантов гороха (Postma *et al.*, 1988). Контроль нодуляции стеблем установлен также у созданной нами линии Торсдаг, маркированной доминантным геном *Nod5*.

У бесклубенькового мутанта К1005м и у мутанта К287а с неэффективными клубеньками симбиотические признаки контролируются корнем. Таким образом, факторы, изменяющие нодуляцию, могут быть продуцированы или в самих корнях, или в стеблях, из которых они могут транспортироваться в корни. Реципрокные прививки и скрещивания разных типов симбиотических мутантов позволяют выявлять характер взаимодействия разных симбиотических генов в одном генотипе.

Физиологические особенности симбиотических мутантов

Развитие и функционирование бобово-ризобиального симбиоза требуют высокой степени регуляции как со стороны макро-, так и микросимбионта. В связи с этим важную роль в интеграции физиологических процессов растения-хозяина и клубеньковых бактерий играют фитогормоны. Результаты многочис-

ленных исследований свидетельствуют о том, что фитогормоны участвуют в формировании и развитии клубеньков, а инокуляция бобовых клубеньковыми бактериями меняет их гормональный статус (Fang, Hirsch, 1998; Павлова, Лутова, 2000; Stougaard, 2000). Даже на ранних стадиях формирования симбиоза роль фитогормонов весьма существенна. Так, у растений белого клевера уже через 30 часов после инокуляции клубеньковыми бактериями обнаружена повышенная экспрессия ауксинстимулируемых генетических локусов, что отражает повышенную активность ауксина в корнях (Mathesius *et al.*, 1997). Другие авторы наблюдали повышение уровня ауксина в корнях гороха, достигающее максимума на 4–6-е сутки после инокуляции, с последующим снижением к 11-м суткам. В то же время в корнях неинфицированных растений уровень ауксина менялся незначительно.

У разных типов симбиотических мутантов гороха наблюдали неодинаковую чувствительность к синтетическому ауксину 2,4-D (Павлова и др., 2000).

Следует отметить, что до сих пор исследования гормонального баланса у макросимбионта проводились на начальных этапах нодуляции. В то же время представляло интерес выяснить влияние зрелых азотфиксирующих клубеньков на гормональный статус бобового растения.

В наших исследованиях стояла задача изучить гормональный статус у симбиотических мутантов гороха, различающихся по клубенькообразованию, а также выяснить влияние инфицирования *Rhizobium* на уровень фитогормонов у макросимбионта. В опытах использовали современные методы анализа фитогормонов, описанные в работах ряда авторов (Кудоярова и др., 1986; Гюли-Заде, 1990; Холодарь и др., 1995). В первом опыте определяли уровень ауксина у исходного сорта Рамонский 77 и трех симбиотических мутантов: бесклубенькового К20а, с неэффективными клубеньками К287 и суперклубенькового К301 в две фазы развития: «7–8-й узел стебля» и «цветение» (табл. 1).

В более позднюю фазу развития (цветение) содержание ауксина было существенно ниже как у исходного сорта, так и у мутантов. В корнях уровень ауксина был ниже, чем в листьях, за исключением суперклубенькового мутанта К301. В раннюю фазу развития у этого

Таблица 1

Содержание ауксина у симбиотических мутантов и исходного сорта гороха Рамонский 77 (нг/г сырой вегетативной массы)*

Сорт, мутант	Орган	Стадия развития	
		7–8-й узел стебля	цветение
Сорт Рамонский 77	Листья	635 ± 100	39,5 ± 5,0
	Корни	117 ± 37	15,0 ± 2,0
Мутанты:			
бесклубеньковый К20а	Листья	325 ± 71	42,5 ± 8,0
	Корни	130 ± 14	32,0 ± 2,5
с неэффективными клубеньками К287	Листья	483 ± 80,5	22,5 ± 4,0
	Корни	159 ± 22	30,0 ± 6,0
суперклубеньковый К301	Листья	269 ± 37	35,5 ± 6,5
	Корни	257 ± 11	154,5 ± 35,0

* Инокуляцию проводили штаммом 250а *Rhizobium leguminosarum*.

мутанта уровень ауксина в листьях и корнях был одинаковый, в то время как у сорта и двух других мутантов в листьях было существенно больше ауксина, чем в корнях. В фазу цветения по содержанию ауксина в корнях суперклубеньковый мутант превысил исходный сорт в 10 раз. У мутантов бесклубенькового и с неэффективными клубеньками в фазу цветения в корнях было в 2 раза больше ауксина, чем у исходного сорта.

Во втором опыте определяли содержание ауксина и гиббереллина в корнях в фазу цветения растений у сорта Рондо и 6 индуцированных симбиотических мутантов: суперклубеньковых (*nod3*, К9а, К10а, К21а) и с единичными клубеньками (К17а и К18а). В опыте было два варианта – с инфицированием штаммом 250а *Rhizobium leguminosarum* и контроль (без инокуляции). Данные по содержанию ауксина у симбиотических мутантов и исходного сорта представлены на рис. 1.

Установлено, что у всех мутантов количество ауксина в варианте с инфицированием было на уровне исходного сорта или ниже. В контрольном варианте у всех изученных форм содержание ауксина оказалось выше, чем при инфицировании.

При обсуждении полученных результатов следует учитывать то обстоятельство, что определение уровня ауксина проводили в позднюю фазу развития (цветение). Важно также отме-

тить, что все мутанты более низкорослые, чем исходный сорт, и менее продуктивные по вегетативной биомассе надземной части растения. Различия в содержании ауксина у суперклубенькового мутанта К301(*nod4*) в первом опыте и суперклубеньковых мутантов К9а(*nod3*) и К21а(*nod6*) во втором опыте можно объяснить прежде всего тем, что клубенькообразование у них контролируется разными генами.

При анализе результатов по содержанию гиббереллинов прежде всего обращает на себя внимание мутант К18а, превысивший исходный сорт по этому фитогормону в 6 раз в обоих вариантах опыта. У мутанта К10а увеличение

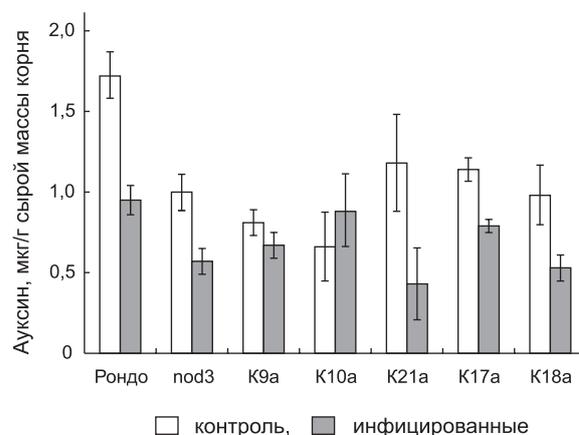


Рис. 1. Содержание ауксина в корнях симбиотических мутантов гороха и исходного сорта Рондо в фазу цветения.

уровня фитогормона, вызванное инокуляцией, было не столь разительным (рис. 2).

Таким образом, у всех изученных симбиотических мутантов гороха изменен гормональный статус по ауксину и гиббереллину в сравнении с исходным сортом. Выявлены различия по содержанию фитогормонов в зависимости от типа мутанта, а также от фазы развития растения. Инфицирование бактериями *Rhizobium* в основном снижало содержание ауксина в корнях как у сорта, так и мутантов.

Большой интерес представляют мутанты K17a и K18a, у которых изменены не только нодуляция, но и тип корня. Мутант K17a имеет сильно разветвленную корневую систему, а у мутанта K18a очень длинный корень. Результаты гибридологического анализа показали, что это две моногенные рецессивные мутации. Мутантный ген, контролирующей сильное ветвление корня у K17a, обозначен символом *brt*, мутантный ген, контролирующей длинный корень у K18a – символом *lrt* (Sidorova *et al.*, 2002) (рис. 3).

Динамика азотфиксации на разных стадиях онтогенеза. Определение эффективности бобово-ризобияльного симбиоза

При оценке эффективности симбиоза обычно используют показатели двух признаков – «число корневых клубеньков» и «активность нитрогеназы», определяемые в фазу цветения растений. Чтобы глубже понять взаимосвязь процессов роста растения, клубенькообразования и фиксации азота, а также установить продолжительность периода активной азотфиксации, нами были изучены морфологические и симбиотические признаки в разные сроки вегетации у исходного сорта гороха Рондо и шести симбиотических мутантов. Среди них один мутант K10a – суперклубеньковый, характеризующийся образованием огромного количества мелких клубеньков. Четыре мутанта – K1a, K2a, K5a, K27a – относятся к типу гиперклубеньковых, клубеньки у них средние и крупные по размеру. Все использованные в данном опыте мутанты отличаются способностью формировать нитратустойчивый симбиоз, особенно это свойство выражено у суперклубеньковых форм. Анализ признаков «высота растения», «коли-

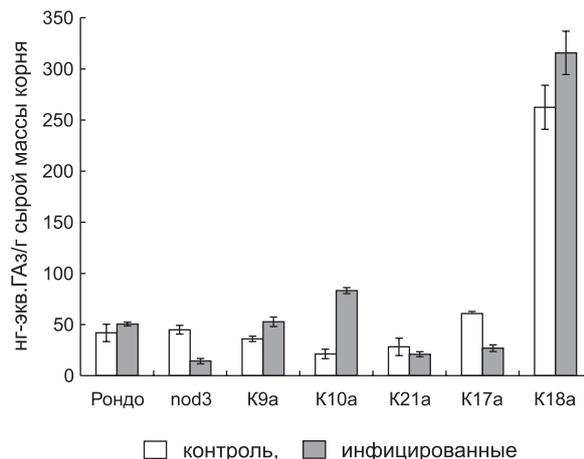


Рис. 2. Содержание гиббереллина в корнях симбиотических мутантов гороха и исходного сорта Рондо.



Рис. 3. Корни гороха.

1 – сорт Рондо; 2 – мутант K18a(ген *lrt*); 3 – мутант K17a(ген *brt*).

чество вегетативной надземной биомассы на одно растение», «число клубеньков» и «активность нитрогеназы» проводили в 5 календарных сроков с интервалом в 7 дней, отмечая фазу развития растений. Первый срок – через 21 день после посева в фазу «7–8-й узел стебля».

Результаты исследований показали, что суперклубеньковый мутант К10а по высоте растений и количеству надземной вегетативной биомассы уступал исходному сорту в течение всего периода вегетации (рис. 4). Для мутанта К10а так же, как и для других суперклубеньковых форм, характерно более быстрое обра-

зование клубеньков в ранние сроки вегетации. К фазе «начало плодообразования» количество клубеньков достигало максимума и существенно превышало по этому показателю исходный сорт. По активности нитрогеназы мутант также значительно превосходил сорт.

У гиперклубеньковых мутантов характер развития морфологических и симбиотических признаков существенно отличается от таковых у суперклубеньковых форм. Это видно на примере гиперклубенькового мутанта К1а, который по величине и динамике изменения признаков «высота растений» и «количество вегетативной

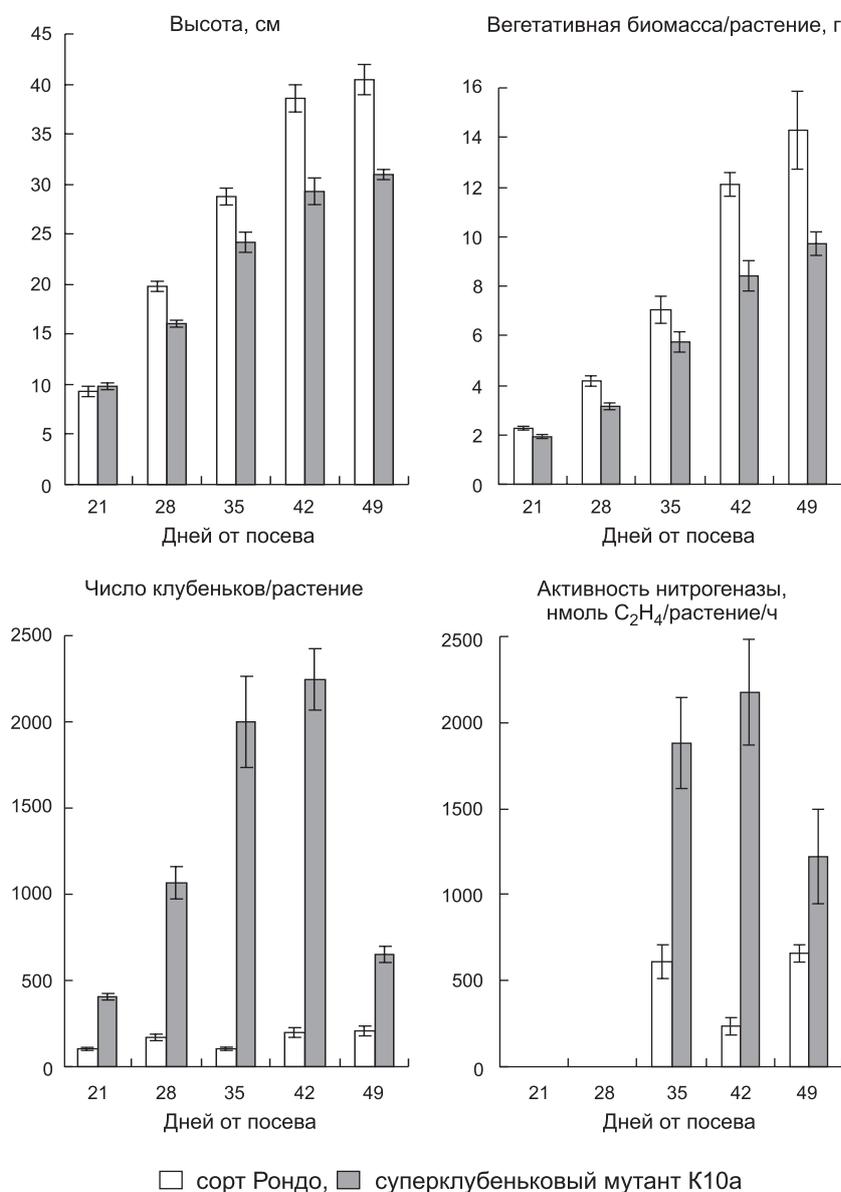


Рис. 4. Морфологические и симбиотические признаки в разные сроки вегетации у исходного сорта Рондо и суперклубенькового мутанта К10а.

надземной биомассы» почти не отличается от исходного сорта, однако по симбиотическим показателям явно его превосходит (рис. 5).

Количество клубеньков во все сроки наблюдений у мутанта было больше, клубеньки у него крупные, как у исходного сорта. Основная масса клубеньков у этого мутанта сформировалась в начале роста растений, и в течение вегетации их количество изменялось незначительно. У мутанта цветение наступает на 4–5 дней раньше, чем у сорта; активность азотфиксации в 3-й и 4-й сроки была в два раза выше, чем у сорта. Другие гиперклубеньковые мутанты, K2a, K7a,

K27a, по морфологическим и симбиотическим признакам, а также по характеру их изменения в процессе вегетации в основном похожи на мутант K1a, хотя и обладают некоторыми индивидуальными особенностями. Так, у мутанта K7a наблюдается небольшое отставание в росте и количестве надземной биомассы по сравнению с сортом в начальные сроки вегетации. К пятому сроку мутант не уступал по этим показателям исходному сорту.

Особого внимания заслуживает мутант K5a (*nod7*), у которого по сравнению с другими мутантами существенно изменены как морфо-

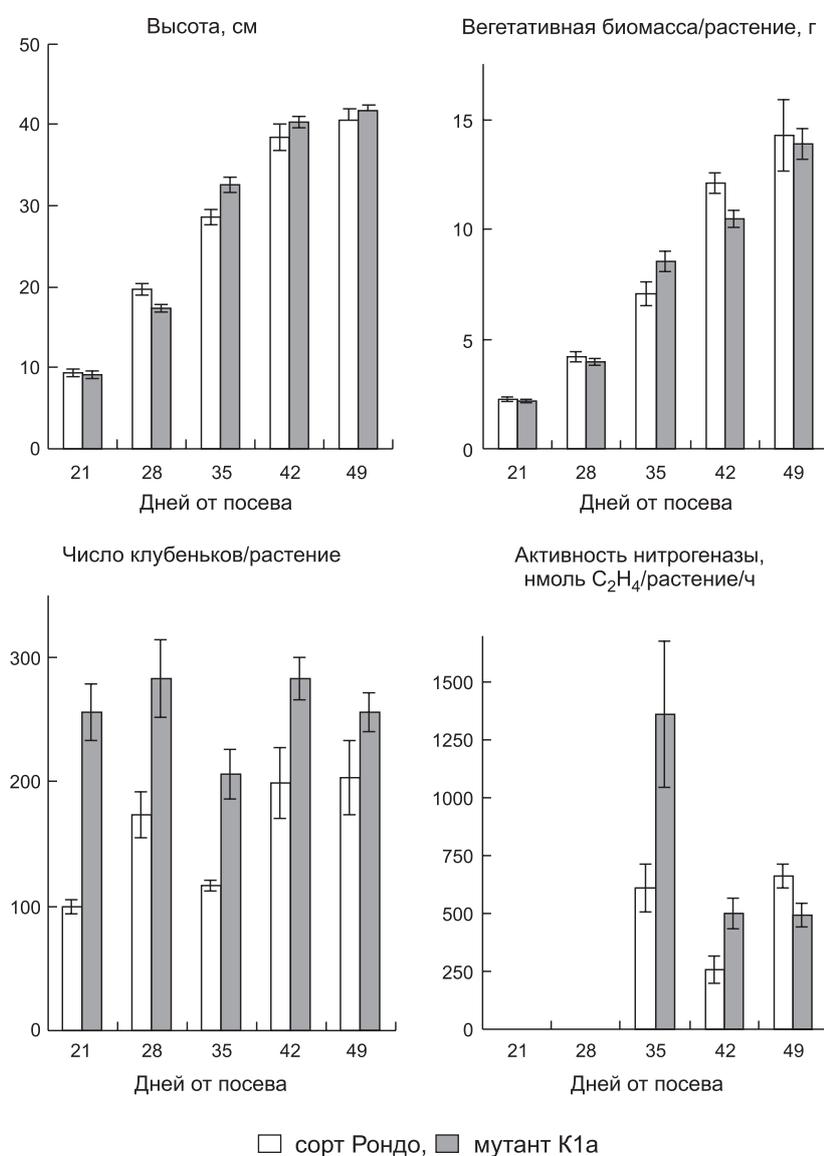


Рис. 5. Морфологические и симбиотические признаки в разные сроки вегетации у исходного сорта Рондо и гиперклубенькового мутанта K1a.

логические, так и симбиотические признаки (Sidorova *et al.*, 2005b). Мутант отличается небольшим накоплением вегетативной биомассы в течение вегетации, хотя по высоте растений он не уступает исходному сорту (рис. 6).

Это обусловлено, вероятно, тем, что мутантные растения имеют очень мелкий лист. Уменьшены размеры как листочков, так и прилистников (рис. 7). Другая особенность этого мутанта – позднее зацветание, на две недели позднее, чем у исходного сорта и описанных выше мутантов.

По количеству клубеньков мутант К5а превосходит как исходный сорт, так и другие мутанты, кроме суперклубенькового К10а. В фазу «начало цветения» у мутанта отмечено максимальное количество клубеньков – около 800 на одно растение. Клубеньки в основном мелкие. Выявлены различия в динамике клубенькообразования. У мутанта К5а отмечен очень резкий скачок в образовании клубеньков в фазу «начало цветения». Несмотря на большое количество клубеньков, активность азотфиксации у мутанта К5а довольно низкая. Можно предполагать, что

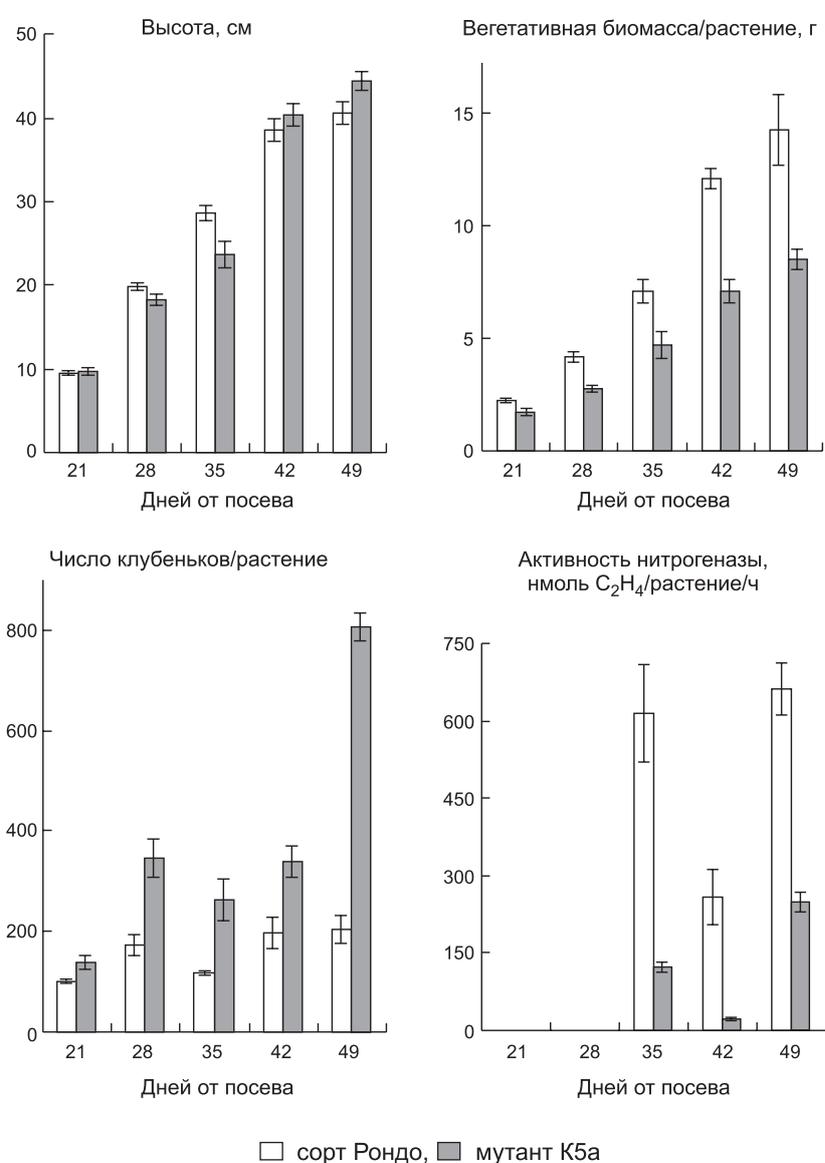


Рис. 6. Морфологические и симбиотические признаки в разные сроки вегетации у исходного сорта Рондо и мутанта К5а.



Рис. 7. Листья гороха.

1 – сорт Рондо; 2 – мутант К5а.

клубеньки оказались недоразвитыми, так как образовались очень поздно. Кроме того, мутант отличается мелколистностью и как результат имеет небольшую площадь листовой поверхности растений, где происходит фотосинтез. А продукты фотосинтеза, как известно, являются главным источником энергии для обеспечения процесса фиксации молекулярного азота из воздуха.

Результаты многолетних исследований симбиогенеза у гороха позволяют утверждать, что макросимбионт играет ключевую роль в генетическом контроле симбиотической азотфиксации в системе бобово-ризобияльного симбиоза и контролирует следующие признаки:

1. Способность растения к симбиозу с клубеньковыми бактериями *Rhizobium*;
2. Количество корневых клубеньков азотфиксирующих бактерий и их эффективность;
3. Активность азотфиксации, определяемую по активности фермента нитрогеназы;
4. Продолжительность периода активной азотфиксации;
5. Способность формировать азотустойчивый симбиоз;
6. Количество корневой биомассы, в том числе бактериальной.

В решении проблемы биологического азота сложным вопросом оказалось определение эффективности бобово-ризобияльного симбиоза. К настоящему времени было известно несколько методов ее оценки, определяемой по количеству фиксированного азота воздуха в полевых и вегетационных опытах (Посыпанов, 1991). Основные из них: метод баланса, меченых атомов, сравнение с небобовой культурой, сравнение с неинокулированной культурой, расчет азотфиксации по величине активного симбиотического потенциала и удельной активности симбиоза. Некоторые методы имеют существенные ограничения и не пригодны для определения эффективности бобово-ризобияльного симбиоза как в полевых, так и вегетационных опытах. Нами предложена принципиально новая модель для определения эффективности бобово-ризобияльного симбиоза как в полевых, так и вегетационных опытах. Модель предусматривает использование в агрохимических опытах симбиотических мутантов бобовых культур, отличающихся от исходных сортов с нормальной нодуляцией и активной азотфиксацией, неэффективными клубеньками или отсутствием таковых. Эти типы мутантов не способны фиксировать азот воздуха и используются как тест-культуры при разностном методе расчетов (Сидорова и др., 2001, 2002; Назарюк и др., 2003, 2004).

Использование симбиотических мутантов в селекции на повышение эффективности бобово-ризобияльного симбиоза

Для практической селекции на повышение у макросимбионта нодуляции и азотфиксации заслуживают внимания два типа мутантов – гиперклубеньковые и суперклубеньковые. Различие в нодуляции у этих двух типов видно на рис. 8. У суперклубеньковых мутантов формируется огромное количество мелких клубеньков, расположенных по всей корневой системе. У гиперклубеньковых клубеньков меньше, но они крупные и расположены в основном в верхней части корня.

Нами впервые получены и генетически изучены гиперклубеньковые мутанты гороха с доминантным наследованием. Мутанты индуцированы из овощного сорта Рондо при воздействии на семена химическим мутагеном



Рис. 8. Корни гороха.

1 – суперклубеньковый; 2 – гиперклубеньковый.

ЭМС. Результаты гибридологического анализа мутантов, представленные в табл. 2, подтверждают доминантный характер наследования.

Были проведены скрещивания доминантных гиперклубеньковых мутантов, индуцированных из сорта Рондо, с линией Торсдаг, маркированной геном *Nod5*, который контролирует гипернодуляцию. Гибриды изучали в F_1 и F_2 поколениях. Установлено, что доминантные мутанты из сорта Рондо и линии Торсдаг с геном *Nod5* аллельны по генетическому контролю гипернодуляции, т. е. по гену *Nod5*.

Симбиотические показатели гиперклубеньковых мутантов показаны на рис. 9.

По количеству корневых клубеньков и активности азотфиксации все мутанты превосходят исходный сорт. Три мутанта, K73a, K74a, K76a, более высокорослые по сравнению с исходным

Таблица 2

Анализ гибридов в F_2 по симбиотическим признакам при скрещивании мутантов с сортом Рондо*

Гибрид	Расщепление в F_2 при 3 : 1 (мутант – исходный сорт)		χ^2	<i>P</i>
K73a × Рондо	44 : 14	43,50 : 14,50	0,02	0,90–0,85
K74a × Рондо	37 : 12	36,75 : 12,25	0,01	0,95–0,90
K75a × Рондо	42 : 14	42,00 : 14,00	0,00	1,00–0,95
K76a × Рондо	42 : 10	39,00 : 13,00	0,92	0,35–0,30

* В F_1 во всех вариантах растения были мутантного типа.

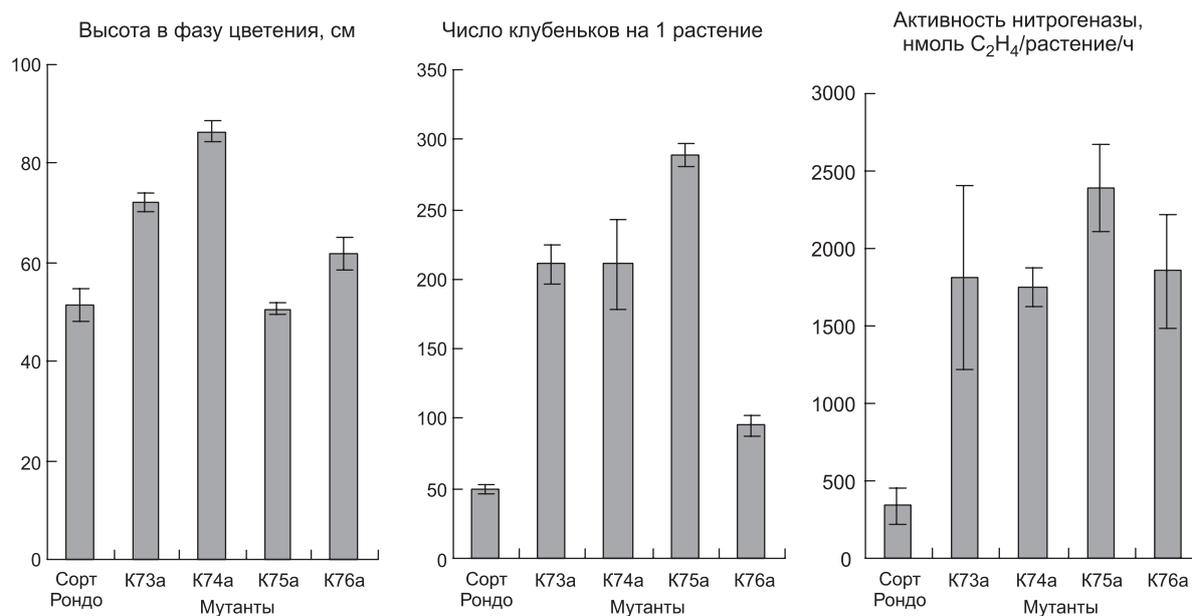


Рис. 9. Симбиотические показатели гиперклубеньковых мутантов гороха.

сортом. Высота растения K75a меньше, чем у сорта. Однако по числу клубеньков и активности азотфиксации он существенно превосходит как сорт, так и все другие мутанты.

Положительной особенностью гиперклубеньковых мутантов является то, что в основном они более продуктивны по сравнению с исходным сортом. Оценка гиперклубеньковых мутантов по признакам, определяющим продуктивность растения, была проведена при выращивании в разных условиях – в поле и теплице (рис. 10).

В условиях теплицы три мутанта, K73a, K74a, K76a, существенно превысили исходный сорт по всем показателям продуктивности. Особого внимания заслуживают два мутанта – K74a и K76a. По семенной продуктивности у них отмечено превышение в 2 и 2,5 раза. В полевых условиях эти мутанты также были наиболее продуктивными.

При проведении гибридологического анализа доминантных симбиотических мутантов с гипернодуляцией во втором поколении впервые на горохе были выделены продуктивные растения в трех гибридных популяциях – K73a, K74a, K75a. В четвертой популяции, K76a, таких растений не обнаружено. Выделенные растения были убраны индивидуально и в F₃ высеяны

отдельными семьями. Две линии, оказавшиеся с расщеплениями, были выбракованы. Оставшиеся 13 константных линий изучены до F₆ поколения в полевых и тепличных условиях.

Внимания заслуживают линии, которые показали высокую продуктивность при выращивании их как в полевых, так и в тепличных условиях. В табл. 3 дана характеристика таким линиям по признакам продуктивности.

Таким образом, гиперклубеньковые мутанты с доминантным наследованием обладают повышенной потенциальной урожайностью и высокой азотфиксацией. Появление в гибридах F₂ при скрещивании этих мутантов с исходными сортами высокорослых продуктивных растений делает возможным проведение отбора и создание новых высокопродуктивных линий с хорошими симбиотическими свойствами, представляющих ценный исходный материал для фундаментальных исследований и селекции на повышение эффективности бобово-ризобияльного симбиоза.

Как уже было отмечено, суперклубеньковые мутанты, характеризующиеся высокой нодуляцией и активной азотфиксацией, имеют серьезный недостаток – они существенно уступают сортам по продуктивности. Однако как предшественники для зерновых культур

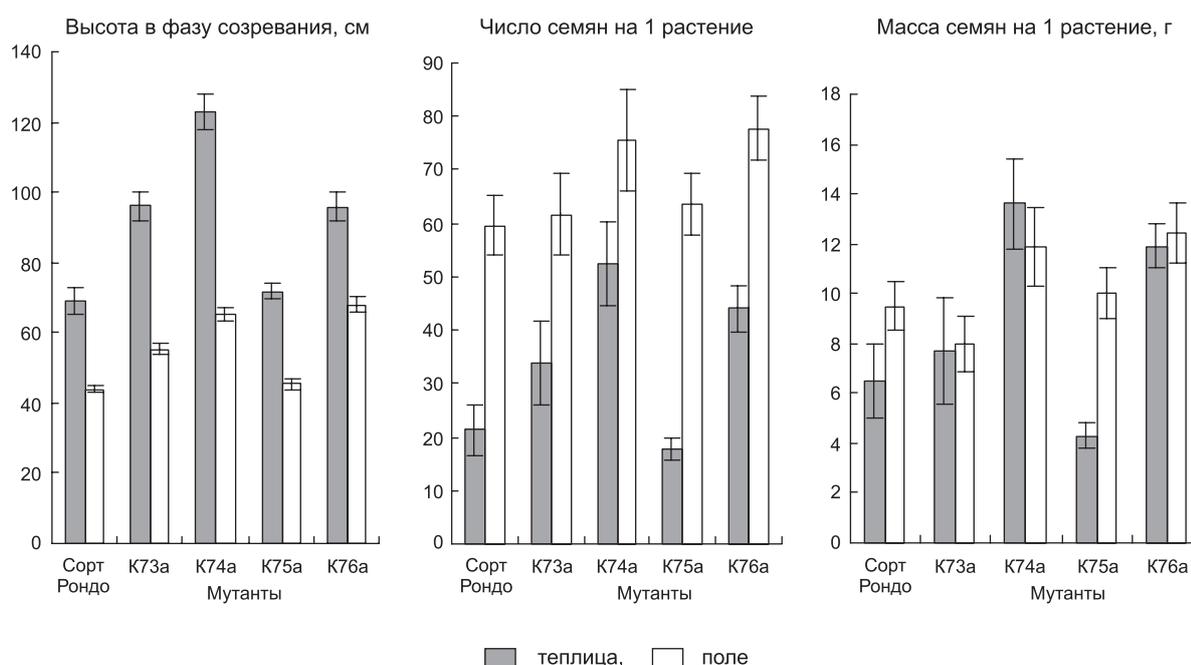


Рис. 10. Продуктивность гиперклубеньковых мутантов в разных условиях выращивания.

Таблица 3

Продуктивность линий, созданных на основе высокорослых продуктивных растений, выделенных в гибридах F₂ при скрещивании гиперклубеньковых мутантов с сортом Рондо*

Вариант	Поле			Теплица		
	Высота, см	На 1 растение		Высота, см	На 1 растение	
		Число семян	Масса семян		Число семян	Масса семян
Мутант K73a	55,4 ± 1,7	61,6 ± 5,8	8,0 ± 1,1	96,0 ± 3,9	34,0 ± 7,8	7,7 ± 2,1
Линии:						
K47a	60,6 ± 1,5	80,5 ± 6,2	11,3 ± 1,0	116,0 ± 3,9	63,5 ± 5,8	15,9 ± 1,5
K51a	70,3 ± 2,2	89,3 ± 7,0	18,2 ± 6,3	119,2 ± 4,3	43,9 ± 3,9	11,0 ± 1,1
Мутант K75a	45,3 ± 1,7	63,4 ± 5,8	10,1 ± 1,0	71,7 ± 2,2	17,9 ± 2,1	4,3 ± 0,5
Линии:						
K59a	59,7 ± 1,4	70,3 ± 8,2	10,2 ± 1,5	99,6 ± 7,3	42,2 ± 11,6	13,0 ± 3,7
K60a	52,3 ± 1,7	74,2 ± 7,5	12,2 ± 1,3	85,1 ± 2,7	30,2 ± 1,9	7,7 ± 0,6
K63a	49,7 ± 1,1	71,3 ± 6,0	11,6 ± 1,1	79,2 ± 2,3	21,3 ± 2,3	6,9 ± 0,7

* Продуктивность сорта Рондо см. на рис. 10.

они показали хорошие результаты в опытах на сое (Gresshoff, 1993; Song *et al.*, 1995) и на горохе (Сидорова и др., 2006б). Использование австралийскими учеными суперклубеньковых мутантов сои при скрещивании с разными сортами не дали положительных результатов (Bhatia *et al.*, 2001). На наш взгляд, это было обусловлено тем, что скрещивания носили случайный характер, т. е. без учета генетических особенностей сортов.

В наших первых опытах мы также провели скрещивания суперклубеньковых мутантов с разными сортами. Была поставлена задача выяснить, можно ли снизить отрицательное влияние супернодуляции на продуктивность растения при переносе гена супернодуляции в другую генотипическую среду. Было установлено, что растения с супернодуляцией, выращенные в гибридных популяциях F₂, в основном были более продуктивными по сравнению с исходными суперклубеньковыми мутантами, но по продуктивности в большинстве случаев уступали сортам. При более тщательном анализе гибридов было установлено, что все-таки есть возможность получить формы с супернодуляцией и хорошей продуктивностью при скрещивании рецессивных суперклубеньковых мутантов с сортами гороха, несущими доминантный ген *Nod5* (Sidorova *et al.*, 2005a, b; Сидорова и др., 2006б).

Был проведен специальный опыт по гибридологическому анализу реципрокных гибридов F₁ и F₂ поколений при скрещивании суперклубенькового мутанта K12a (*nod3*) с линией Торсдаг (*Nod5*). В обеих гибридных популяциях F₂ были выделены высокорослые растения с обильной нодуляцией и активной азотфиксацией. Результаты гибридологического анализа позволили сделать заключение, что такие растения имеют следующие комбинации генов: *Nod5 Nod5 nod3 nod3* или *Nod5 nod5 nod3nod3* (Сидорова и др., 2008).

Аналогичные результаты были получены в другом эксперименте. В качестве исходного материала был использован другой мутант, K10a, маркированный таким же геном супернодуляции *nod3*. При скрещивании с сортом Торсдаг в F₂ были выделены растения с супернодуляцией. На основе каждого растения с супернодуляцией были созданы индивидуальные линии. Проведен рекуррентный отбор до седьмого поколения. По высоте растений все рекуррентные линии существенно превысили суперклубеньковый мутант, но уступили по этому показателю сорту Торсдаг. По семенной продуктивности выделены линии, превысившие как мутант, так и сорт, или имевшие одинаковые показатели с родительскими формами. По симбиотическим признакам – «число клубеньков» и «активность нитрогеназы» – все рекуррентные линии имели

высокие показатели, превышающие таковые даже у суперклубенькового мутанта (рис. 11).

Полученные экспериментальные результаты по использованию суперклубеньковых мутантов в скрещиваниях были учтены в опыте, целью которого являлось повышение нодуляции и азотфиксации у двух коммерческих сортов гороха – Дружная и Новосибирская 1.

В селекционных опытах на повышение азотфиксации у этих сортов гороха кроме сотрудников ИЦиГ СО РАН участвовали сотрудники СибНИИРС РАСХН акад. РАСХН П.Л. Гончаров и чл.-корр. РАСХН А.В. Гончарова.

В генотипе обоих сортов есть доминантный ген *Nod5*. Сорта скрещивали с суперклубеньковым мутантом К301 (*nod4*), индуцированным из сорта Рамонский 77. В F₂ были выделены растения с супернодуляцией. На основе каждого растения создана индивидуальная линия. Изучение линий проведено до седьмого поколения с использованием рекуррентного отбора по продуктивности и симбиотическим показателям – «нодуляция» и «азотфиксация».

В результате по каждому сорту выделено по семь лучших линий, характеризующихся высокой продуктивностью, сильной нодуляцией и активной азотфиксацией. На рис. 12 дана ха-

рактеристика рекуррентных линий, созданных на основе сорта Дружная.

Выявлена закономерность – по высоте растений большинство линий не отличались от сорта. По семенной продуктивности, наоборот, все линии превосходили сорт. Выделены линии, у которых превышение по семенной продуктивности было весьма существенным.

По сорту Новосибирская 1 в общем наблюдалась такая же закономерность, но была менее ярко выражена.

У всех рекуррентных линий, созданных на основе обоих сортов, нодуляция была более сильной, чем у суперклубенькового мутанта. Количество клубеньков на одно растение превышало 1500–2000 шт. в опыте с сортом Дружная и 2500–3000 шт. в опыте по сорту Новосибирская 1. Такие линии получили название «ультрасуперы» (рис. 13).

Активность азотфиксации, измеряемая по активности нитрогеназы, у всех рекуррентных линий была существенно выше, чем у сортов. Наиболее высокие показатели по активности азотфиксации установлены у рекуррентных линий, при создании которых в качестве материнского растения использовали сорта Дружная и Новосибирская 1 (табл. 4).

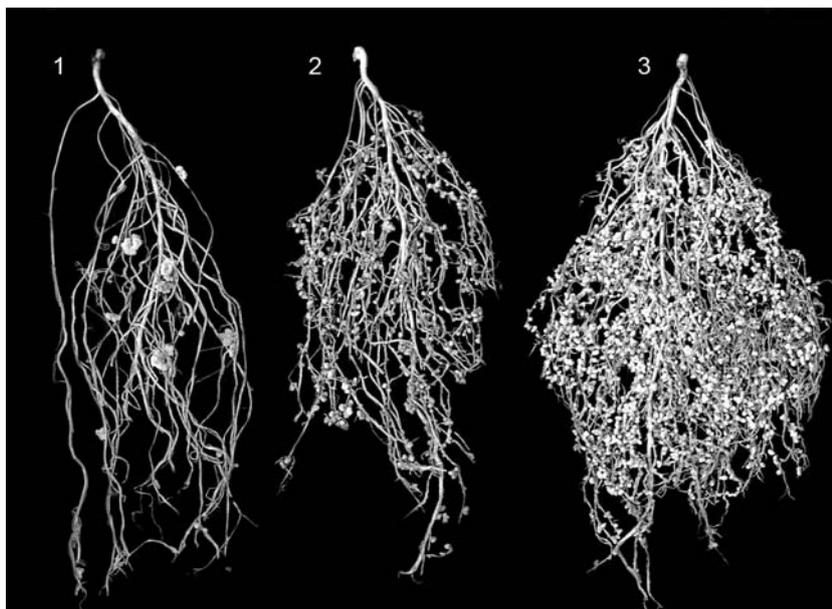


Рис. 11. Корни гороха.

1 – сорт Рондо, 2 – мутант К10а, 3 – рекуррентная линия, созданная при скрещивании К10а × Торсдаг.

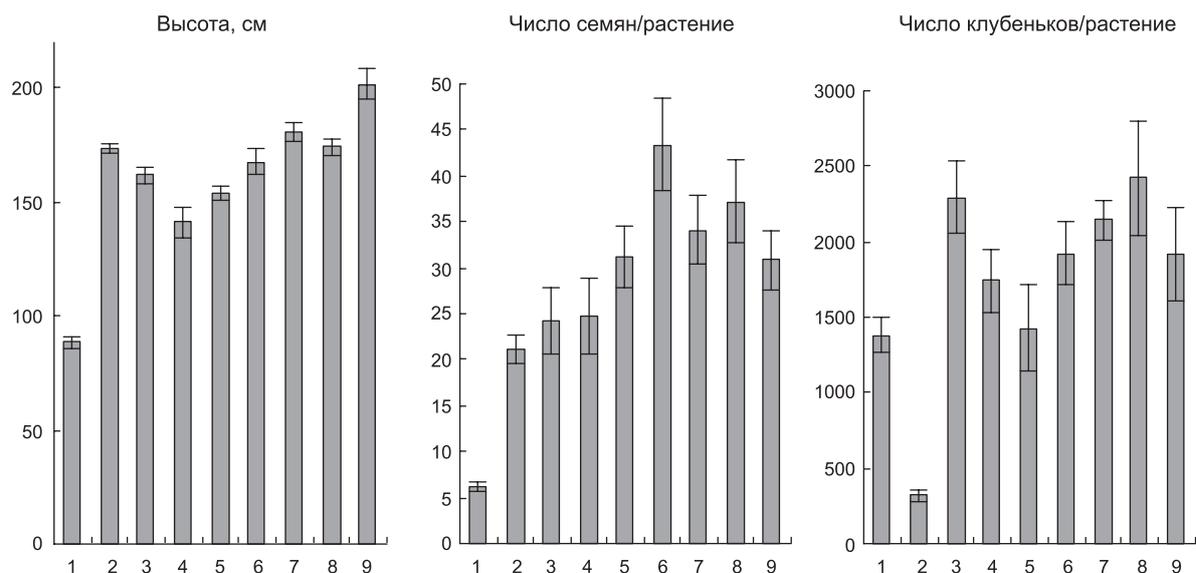


Рис. 12. Характеристика рекуррентных линий, полученных при скрещивании сорта Дружная с суперклубеньковым мутантом К301.

1 – мутант К301; 2 – сорт Дружная; 3–7 – рекуррентные линии К701а, К704а, К705а, К711а, К712а созданы при скрещивании Дружная × К301; 8, 9 – рекуррентные линии К720а, К723а созданы при скрещивании К301 × Дружная.

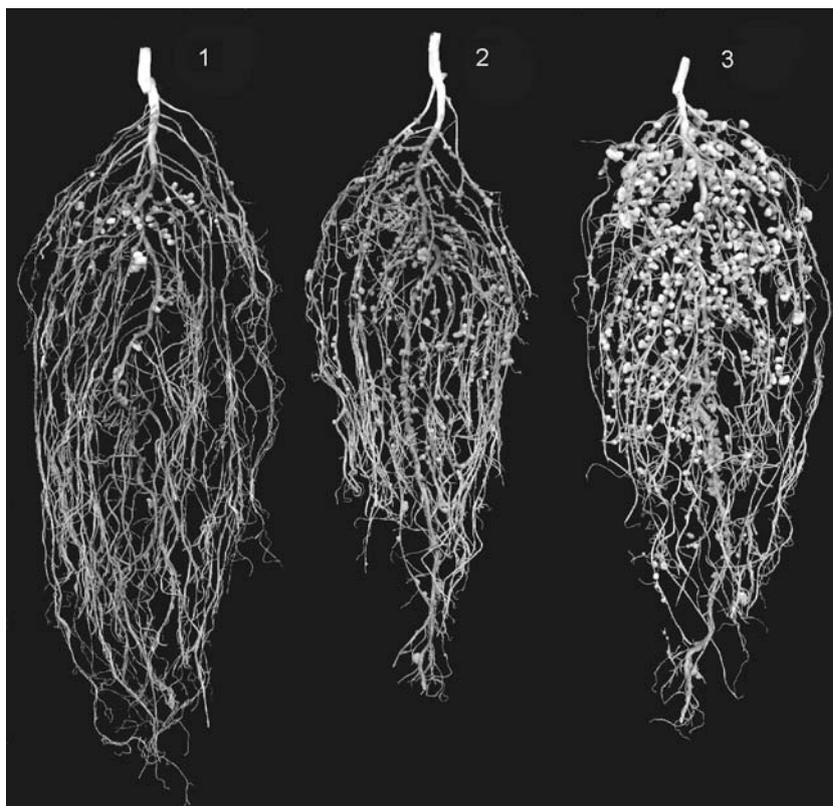


Рис. 13. Корни гороха.

1 – сорт Дружная (*Nod5*); 2 – суперклубеньковый мутант К301а, (*nod4*); 3 – рекуррентная линия К720а ультрасупер (*nod4 Nod5*).

Таблица 4

Активность азотфиксации у сортов и рекуррентных линий

Мутант, сорт	Активность нитрогеназы, нмольС ₂ Н ₄ /растение/ч	Рекуррентные линии	Активность нитрогеназы, нмольС ₂ Н ₄ /растение/ч
Суперклубеньковый мутант К301	1242	К301 × Дружная Дружная × К301	1123–1226 2312–2380
Сорт Дружная	424	К301 × Новосибирская 1	1235–2107
Сорт Новосибирская 1	463	Новосибирская 1 × К301	2399–2702

Бобовые культуры являются улучшателями почв и хорошими предшественниками для последующих культур. Созданные нами рекуррентные линии по показателям количества вегетативной биомассы корней и содержанию в них азота значительно превышают коммерческие сорта гороха (табл. 5).

Сильное разрастание корневой системы у рекуррентных линий и повышенное содержание в корнях азота можно объяснить присутствием в их генотипе гена супернодуляции *nod4* и благоприятной генотипической средой, в которую входит ген *Nod5*.

Таким образом, нами получены и генетически изучены симбиотические мутанты гороха, которые позволяют контролировать такие важные звенья азотфиксации, как количество

корневых клубеньков азотфиксирующих бактерий, их размеры, активность азотфиксации и ее продолжительность за период вегетации. Комбинации доминантных и рецессивных аллелей разных симбиотических генов позволяют получать формы, не уступающие промышленным сортам по продуктивности, но значительно превосходящие их по накоплению в почве большего количества корневой биомассы с высоким содержанием в ней азота. Это способствует улучшению плодородия почв и сокращению использования минеральных азотных удобрений, а также открывает перспективы новых генетико-селекционных технологий обеспечения растений азотом через симбиотический комплекс, что является важным с точки зрения экологии и энергосбережения.

Таблица 5

Накопление сырой и сухой биомассы корней и содержание в них азота у сортов и рекуррентных линий гороха*

Вариант	Количество сырой биомассы корней		Количество сухой биомассы корней		Содержание азота в сухих корнях	
	г/растение	кг/га	г/растение	кг/га	%	кг/га
Суперклубеньковый мутант К301	1,8 ± 0,1	2160	0,15 ± 0,01	180	4,48	8,06
Сорт Дружная	1,3 ± 0,1	1560	0,14 ± 0,00	168	3,19	5,36
Рекуррентные линии:						
К701а	2,6 ± 0,2	3120	0,23 ± 0,02	276	4,08	11,26
К714а	2,7 ± 0,2	3240	0,28 ± 0,00	336	4,64	15,59
Сорт Новосибирская 1	1,2 ± 0,1	1440	0,14 ± 0,00	168	3,04	5,11
Рекуррентные линии:						
К724а	3,3 ± 0,5	3960	0,25 ± 0,03	300	3,97	11,91
К727а	4,8 ± 0,6	5760	0,33 ± 0,06	396	4,64	18,37

* Расчеты выполнены по общепринятой методике 1,2 млн растений на 1 га.

Литература

- Вавилов П.П., Посыпанов Г.С. Бобовые культуры и проблема растительного белка. М.: Россельхозиздат, 1983. 255 с.
- Гюли-Заде В.З. Иммуноанализ и изучение росторегулирующей функции ауксинов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Казань: Казанский институт биологии АН СССР, 1990. 26 с.
- Доросинский Л.М. Клубеньковые бактерии и нитрогены. Л.: Колос, 1970. 191 с.
- Захаров И.А. 100 лет теории симбиоза // Информ. вестник ВОГиС. 2009. Т. 13. № 2. С. 355–361.
- Игнатов В.В. Биологическая фиксация азота и азотфиксаторы // Соросовский образоват. журнал. 1998. № 9. С. 28–33.
- Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Еркеев М.И., Гюли-Заде В.З. Иммуноферментное определение содержания индолилуксусной кислоты в семенах кукурузы с использованием меченых антител // Физиол. растений. 1986. Т. 33. № 6. С. 376–377.
- Маргелис Л. Роль симбиоза в эволюции клетки. М.: Мир, 1983. 351 с.
- Назарюк В.М., Сидорова К.К., Шумный В.К., Кленова М.И. Новый метод определения эффективности бобово-ризобиального симбиоза в полевых условиях // Агрехимия. 2003. № 1. С. 77–83.
- Назарюк В.М., Сидорова К.К., Шумный В.К., Кленова М.И. Роль генотипа макросимбионта в усвоении азота из почвы и воздуха // Докл. РАН. 2004. Т. 394. № 1. С. 139–141.
- Павлова З.Б., Добродумова В.В., Кравченко Л.В., Лутова Л.А. Характеристика некоторых симбиотических мутантов гороха по признакам, связанным с гормональным статусом // Генетика. 2000. Т. 36. № 9. С. 799–804.
- Павлова З.Б., Лутова Л.А. Клубенькообразование как модель для изучения дифференцировки у высших растений // Генетика. 2000. Т. 36. № 6. С. 1173–1188.
- Посыпанов Г.С. Методы изучения биологической фиксации азота воздуха. М.: Агропромиздат, 1991. 300 с.
- Сидорова К.К., Назарюк В.М., Кленова М.И. Способ оценки азотфиксирующей способности бобовых культур: Патент на изобретение. № 2195104. М. 27 декабря 2002.
- Сидорова К.К., Назарюк В.М., Шумный В.К., Кленова М.И. Новая модель для определения эффективности бобово-ризобиального симбиоза // Докл. РАН. 2001. Т. 380. № 2. С. 283–285.
- Сидорова К.К., Столярова С.Н., Катыхшева В.Б. Азотфиксирующая активность у мутантов гороха // Генетика. 1987. Т. 23. № 7. С. 1218–1221.
- Сидорова К.К., Ужинцева Л.П. Использование мутантов для выявления генов, контролируемых симбиотические признаки у гороха // Генетика. 1992. Т. 28. № 4. С. 144–151.
- Сидорова К.К., Ужинцева Л.П. Локализация мутантного гена *nod4*, контролирующего супернодуляцию у гороха // Докл. РАН. 1994. Т. 336. № 6. С. 847–849.
- Сидорова К.К., Шумный В.К. Новый ген гороха (*Pisum sativum* L.) *Nod5-nod5*, контролирующей нодуляцию // Докл. РАН. 1997. Т. 353. № 5. С. 703–704.
- Сидорова К.К., Шумный В.К. Исследование суперклубеньковых мутантов гороха (*Pisum sativum* L.) // Генетика. 1998. Т. 34. № 10. С. 1452–1454.
- Сидорова К.К., Шумный В.К. Генетика симбиотической азотфиксации и основы селекции для самоопыляющихся бобовых культур (на примере *Pisum sativum* L.) // Генетика. 1999. Т. 35. № 11. С. 1550–1557.
- Сидорова К.К., Шумный В.К. Создание и генетическое изучение коллекций 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. Изучение морфологических и симбиотических признаков в динамике онтогенеза у суперклубенькового и гиперклубеньковых мутантов гороха // Генетика. 2006а. Т. 42. № 2. С. 219–225.
- Сидорова К.К., Шумный В.К., Власова Е.Ю. и др. Взаимодействие двух симбиотических генов *nod3* и *Nod5* в одном генотипе гороха *Pisum sativum* L. // Докл. РАН. 2008. Т. 419. № 4. С. 569–571.
- Сидорова К.К., Шумный В.К., Гляненько М.Н. и др. Исследование доминантных симбиотических мутантов гороха *Pisum sativum* L. // Генетика. 2009. Т. 45. № 7. С. 907–912.
- Сидорова К.К., Шумный В.К., Мищенко Т.М. Хромосомная локализация гена *Nod5*, контролирующего нодуляцию у гороха // Докл. РАН. 1999. Т. 367. № 6. С. 851–852.
- Сидорова К.К., Шумный В.К., Назарюк В.М. Симбиотическая азотфиксация: генетические, селекционные и эколого-агрехимические аспекты. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2006б. 134 с.
- Холодарь А.В., Швецов С.В., Чекуров В.М. Применение иммуноферментного анализа для изучения фоторегуляции уровня гиббереллинов в этиопластах из листьев мягкой пшеницы // Физиол. растений. 1995. Т. 42. № 4. С. 647–651.
- Bhatia C.R., Nichterlein K., Maluszynski M. Mutations affecting nodulation in grain legumes and their potential in sustainable cropping systems // Euphytica. 2001. V. 120. P. 415–432.
- Duc G., Messenger A. Mutagenesis of pea (*Pisum sativum* L.) and the isolation of mutants for nodulation and nitrogen fixation // Plant Sci. 1989. V. 60. P. 207–213.
- Fang Y., Hirsch A.M. Studying early nodulin gene ENOD40 expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic Alfalfa // Plant Physiol. 1998. V. 116. P. 53–68.

- Gresshoff P.M. Molecular genetic analyses of nodulation genes in soybean // *Plant Breed. Rev.* 1993. V. 11. P. 275–318.
- Herridge D., Rose J. Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes // *Field Crops Res.* 2000. V. 65. P. 229–248.
- Jacobsen E., Nijdam H.A. A mutant showing efficient nodulation in the presence of nitrate // *Pisum Newsl.* 1983. V. 15. P. 31–32.
- Kneen B.E., LaRue T.A. Induced symbiosis mutants of pea (*Pisum sativum*) and sweet clover (*Melilotus alba* annual) // *Plant Sci.* 1988. V. 58. P. 177–182.
- Mathesius U., Djordjevic M.A., Weinmann J.J. *et al.* Transient auxin transport inhibition and localised flavonoid induction occur during the earliest stages of nodulation in white clover // *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century* / Eds C. Elmerich, A. Condorosi, W.E. Newton. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Acad. Publ., 1997. P. 311–312.
- Postma J.G., Jacobsen E., Feenstra W.J. Three pea mutants with an altered nodulation studied by genetic analysis and grafting // *J. Plant. Physiol.* 1988. V. 132. P. 424–430.
- Sagan M., Huguët T., Duc G. Phenotypic characterization and classification of nodulation mutants of pea (*Pisum sativum* L.) // *Plant Sci.* 1994. V. 100. P. 59–70.
- Sidorova K.K., Shumny V.K., Mischenko T.M., Vlasova E.Yu. A new gene for supernodulation in pea: *nod6* // *Pisum Genet.* 2003. V. 35. P. 28–29.
- Sidorova K.K., Shumny V.K., Vlasova E.Yu. *et al.* Interaction of two symbiotic genes within a single genotype // *Pisum Genet.* 2005a. V. 37. P. 34–36.
- Sidorova K.K., Shumny V.K., Vlasova E.Yu. *et al.* A new pea symbiotic mutant *nod7* // *Pisum Genet.* 2005b. V. 37. P. 37–38.
- Sidorova K.K., Shumny V.K., Vlasova E.Yu. *et al.* The *Brt* (Branch Roots) and *Lrt* (Long Roots) genes control the development of roots in peas (*Pisum sativum* L.) // *Pisum Genet.* 2002. V. 34. P. 23–24.
- Sidorova K.K., Shumny V.K., Vlasova E.Yu., Mischenko T.M. Dominant symbiotic pea mutants // *Pisum Genet.* 2001. V. 33. P. 35.
- Sidorova K.K., Uzhintseva L.P. Mapping of *nod-4*, a new hypernodulating mutant in pea // *Pisum Genet.* 1995. V. 27. P. 21.
- Sidorova K.K., Vlasova E.Yu., Mischenko T.M. *et al.* A study of supernodulation pea mutants // *Pisum Genet.* 1999. V. 31. P. 34.
- Song L., Carroll B.J., Gresshoff P.M., Herridge D.F. Field assessment of supernodulating genotypes of soybean for field, N₂ fixation and benefit to subsequent crops // *J. Soil Biol. Biochem.* 1995. V. 27. № 4/5. P. 563–569.
- Stougaard J. Regulators and regulation of legume root nodule development // *Plant Physiol.* 2000. V. 124. P. 531–540.

GENETICS OF SYMBIOSIS AND BREEDING OF A MACROSYMBIONT FOR INTENSE NITROGEN FIXATION BY THE EXAMPLE OF PEA

K.K. Sidorova, V.K. Shumny, E.Yu. Vlasova, M.N. Glyanenko,
T.M. Mischenko, G.G. Maystrenko

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

Summary

The article summarizes the results of long-term experimental studies on genetics of symbiosis and breeding of the macrosymbiont in the legume–rhizobium symbiosis by the example of pea (*Pisum sativum* L.). A collection of symbiotic pea mutants has been obtained, and its genetic analysis has been performed. New symbiotic genes have been identified and mapped on pea chromosomes. For the first time, dominant symbiotic mutations have been induced in pea. They show high productivity and intense nitrogen fixation. Physiological features of the symbiotic mutants associated with the contents of auxins and gibberellins have been studied. The mutants differ in nitrogen fixation rate at various developmental stages. Accessions with prolonged active nitrogen fixation have been obtained. A new method of determining the efficiency of legume–rhizobium symbiosis is proposed. We pioneer in the development of a method for using symbiotic mutants in breeding for intense nitrogen fixation. It is based on interaction of different *sym* genes in one genotype. A set of constant recurrent lines of generation 7 has been obtained. They overpower currently grown pea cultivars in nodulation and nitrogen fixation rates. They accumulate large root biomass rich in nitrogen. Owing to this feature, they are promising for use in agriculture instead of expensive organic and inorganic fertilizers.

Key words: genetic of symbiosis, macrosymbiont, pea, nodulation, nitrogen fixation, breeding.