

УДК 631.461.52:633.11

## РОЛЬ ГЕНОТИПА ПШЕНИЦЫ В ФОРМИРОВАНИИ АЗОТФИКСИРУЮЩЕЙ АССОЦИАЦИИ БАКТЕРИЙ В ПРИКОРНЕВОЙ ЗОНЕ

М. И. ЧУМАКОВ

(Кафедра микробиологии)

Исследовали активность ассоциативной азотфиксации (ацетиленредукции) у 9 видов пшеницы рода *Triticum*, различающихся по уровню плоидности и составу генома. Выявлен полигенный характер наследования *nis*-признака у гексаплоидных пшениц (геном ABD).

Исследование азотфиксирующих ассоциаций бактерий с небобовыми растениями в основном проводили на микробном компоненте. Роль растения-хозяина в формировании и контроле ассоциации остается практически неизученной. Первые работы в этом направлении появились немногим более десяти лет назад [15, 17, 18, 21]. С тех пор накоплено относительно мало информации по данной проблеме. Если обратиться к симбиозу между *Rhizobium* и бобовыми растениями как к наиболее близкому и хорошо изученному аналогу ассоциации, то можно заметить, что он контролируется генетически обоими «партнерами», причем роль растения-хозяина в формировании симбиоза является ведущей [5]. В последние годы доказано, что небобовые растения благодаря корневым выделениям и корневому опадку поддерживают в ризосфере и ризоплане популяцию бактерий [9, 10]. Однако неизвестно, контролируется ли этот процесс генетически со стороны растения-хозяина. В ряде работ показана родовая, видовая и сортовая вариабельность ассоциативной азотфиксации у различных злаков [3, 19]. Были предприняты попытки вести селекцию на способность растений кукурузы и проса поддерживать ассоциативную азотфиксацию (*nis*-признак) [13, 14, 16]. Исследования в данном направлении, безусловно, интересны и в практическом плане, поскольку за счет ассоциативной азотфиксации растение может удовлетворять  $1/3$ — $2/3$  потребности в азоте [11, 12]. В предлагаемой статье рассматривается распространение *nis*-признака у видов, групп сортов, линий из рода *Triticum* L.

### Методика

Активность ассоциативной азотфиксации исследовали у 30 образцов из мировой коллекции ВИР, принадлежащих к роду *Triticum* L. Моносомные линии пшеницы сорта Саратовская 46 получены из НПО «Элита Поволжья». Зерна для проращива-

ния раскладывали в чашки Петри на 1,2 % агар. После проклеивания их переносили в сосуды ( $h=150$  мм,  $d = 15$  мм) с агаризованной средой (5 мл) [25] следующего состава (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,4,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 0,4,  $\text{NaCl}$  — 0,1,  $\text{MgSO}_4$  — 0,2,

MnSQ<sub>4</sub> — 0,001, FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O — 0,01, CaCl<sub>2</sub> — 0,02, дрожжевой экстракт «Диффо» — 0,02, агар — 3,0.

Проростки инокулировали почвенной суспензией на 3—6-й день, предварительно выбраковывая пораженные грибной и бактериальной инфекцией. Для их инокуляции использовали каштановую почву, взятую с поля Ершовской опытной станции орошаемого земледелия (Саратовская область), на котором в течение трех лет возделывали пшеницу. Водную суспензию почвы (почва : вода = 1 : 2) обрабатывали на гомогенизаторе РРW-302 (ПНР) при 5 тыс. об/мин в течение 5 мин для десорбции микроорганизмов с поверхности почвенных частиц. Доза инокуляции 0,5 мл на одно растение. Использовали почву одного и того же образца (фракции диаметром 1,5; 1,0; 0,4; 0,2; 0,1 мм в одинаковых пропорциях). В одном опыте испытывали от 6 до 28 растений одного сорта. В качестве репера использовали сорт Саратовская 29.

Растения выращивали в сосудах под ватными пробками в климатокамере ВКШ-1 при продолжительности светового дня 16 ч.

Дневная температура 25—30 °С, ночная 15—20 °С.

Активность азотфиксации определяли у 2-недельных проростков методом ацетиленредукции на хроматографе ЛХМ-8 МД. Количество ацетилена составляло 5—10 % к объему газовой фазы, инкубация растений продолжалась 24—72 ч. Активность азотфиксации рассчитывали по формуле

$$A_f = \lg \frac{A_v}{mT} (\text{нг C}_2\text{H}_2/\text{г корня} \cdot \text{сут}^{-1}),$$

где  $A_f$  — количество этилена, нг в 1 мл газовой фазы;  $v$  — объем газовой фазы сосуда, мл;  $m$  — масса корня, мг;  $T$  — продолжительность, сут. Было два контроля — без растения и растение без инокуляции.

При статистической обработке результатов проводили сравнение средних арифметических значений по критерию Стьюдента и выборку по критерию Фишера. Данные обрабатывали на мини-ЭВМ «Электроника ДЗ-28» по программе «Биометрик», разработанной в ИБФРМ АН СССР А. Д. Иосипенко и А. Г. Мельниковым.

## Результаты

Растения поглощают минеральный азот из почвы и азот, фиксированный биологическим путем. Поглощение последнего обусловлено недостатком минерального азота в почве.

Можно предположить, что изменения, которые произошли в процессе эволюции пшеницы, не могли не затронуть такого важного для жизни растения фактора, как обеспеченность его биологическим азотом.

Т а б л и ц а 1

Активность ассоциативной азотфиксации у пшениц, различавшихся по уровню плоидности ( $\lg$  нг C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/г корней • сут<sup>-1</sup>)

Группа видов	Количество сортов	Количество образцов	Плоидность (n=7)	X	S	W, %	P, %	F	QF, %	td	P <sub>td</sub> , %
Диплоиды (геном А) — контроль	6	90	2n	1,75	0,91	52,16	5,30				
Тетраплоиды (геном АВ)	9	223	4n	2,25	0,66	29,08	2,62	1,91	99,46	4,14	99,99
Тетраплоиды (геном АG)	2	22	4n	2,55	0,67	26,44	5,64	1,83	94,25	4,70	99,99
Гексаплоиды (геном АВD)	8	66	6n	2,77	0,79	28,37	3,49	1,34	89,72	7,66	100,00
Октоплоиды (геном ААGГ)	1	8	8n	2,42	0,50	20,65	7,30	3,33	95,22	3,33	99,88

Нами исследовался на *nis*-активность ряд сортов различных уровней полиплоидии: диплоидный (2n=14), тетраплоидный (2n = 28), гексаплоидный (2n=42), октоплоидный (2n = 56). Если принять за единицу *nis*-активность на диплоидном уровне организации *Triticum*, то при переходе на тетраплоидный уровень она возрастает в среднем на 37 % (среднее из показателей двух групп тетраплоидов с геномами АВ и АG). У проверенных на *nis*-признак сортов с гексаплоидным набором хромосом активность ассоциативной азотфиксации была на 59 % выше, чем у группы сортов с диплоидным набором хромосом, разность достоверна при P<0,05. У сорта с октоплоидным набором хромосом активность ацетиленредукции на 38 % превысила контроль (табл. 1).

Таким образом, при увеличении кратности набора хромосом у пшеницы возрастает *nis*-активность в полиплоидном ряду.

До настоящего времени селекция пшеницы на повышение способности использовать биологический азот не проводилась. Поэтому отбор и закрепление способности к ассоциативной азотфиксации, возможно, осуществляли в связи с другими хозяйственно полезными признаками, например качеством зерна и урожайностью. В работе [1] отмечается, что продуктивность зерна у дикорастущих и возделываемых форм пшеницы независимо от уровня плоидности на богатых агрофонах практически одинаковая. Этим, вероятно, объясняются относительно небольшие различия по *nis*-признаку в полиплоидном ряду. Виды пшеницы достоверно отличаются по *nis*-признаку от *T. monocossum* (табл. 2). Наи-

Таблица 2

Активность ассоциативной азотфиксации у различных видов пшеницы  
(1 г н г  $\text{QN}_4/\text{г}$  корней  $\cdot \text{сут}^{-1}$ )

Вид пшеницы	Количество сортов	Количество образцов	X	S	W, %	P, %	F	QF, %	td	P <sub>id</sub> , %
<i>T. monocossum</i> (геном А) — контроль	6	93	1,74	0,89	53,12	51,23				
<i>T. durum</i> (геном АВ)	1	6	2,47	0,18	7,08	2,89	2,58	99,92	6,24	100,00
<i>T. dicossum</i> (геном АВ)	5	51	2,28	0,60	26,33	3,69	2,19	99,86	4,25	99,99
<i>T. dicocoides</i> (геном АВ)	4	64	2,13	0,63	29,38	3,67	2,09	99,84	3,13	99,79
<i>T. militinae</i> (геном А)	1	7	2,79	0,52	18,71	7,07		Не определяли		
<i>T. timopheevii</i> (геном А)	2	15	2,44	0,72	29,71	7,67	1,51	80,61	3,31	99,61
<i>T. vavilovii</i> (геном ABD)	5	23	2,56	0,50	19,54	4,08	3,17	99,84	5,49	
<i>T. aestivum</i> (геном ABD)	5	31	3,10	0,92	29,54	5,31	1,06	59,57	7,23	100,00
<i>T. timonovum</i> (геном AAGG)	1	8	2,29	0,25	10,94	3,87	12,56	99,92	4,30	99,99

большая активность ассоциативной азотфиксации характерна для *T. aestivum* (геном ABD), широко распространенного в практическом земледелии, что позволяет надеяться на поиск сортов в пределах указанного вида, которые сочетали бы *nis*-признак с рядом ценных свойств. Необходимо отметить, что часть сортов вида *T. aestivum* была представлена сортами старой селекции (Русак, Полтавка), у которых *nis*-активность весьма высокая. По-видимому, именно сорта старой селекции могут послужить донорами высокой ассоциативной азотфиксации. В то же время у сортов современной селекции на высоких азотных фонах может значительно снижаться *nis*-активность [23, 24]. Из этого следует, что для характеристики *nis*-признака у вида, который давно используется в селекции, необходимо исследовать сорта старой и новой селекции.

У видов пшениц, возникших эволюционно позже однозернянок (кроме *T. dicocoides*, *T. timopheevii*), по нашим данным, активность ассоциативной азотфиксации достоверно выше (табл. 2). Отмечены значительные внутрисортные различия по *nis*-признаку у пшеницы (табл. 3). Особенно большие коэффициенты вариации были у сортов, относящихся к виду *T. monocossum* (табл. 2); следовательно, этот вид наиболее подвижен по признаку ассоциативной азотфиксации. На большую изменчивость *nis*-признака в пределах одного сорта как у бобовых растений, так и у пшеницы указывают многие исследователи [2, 4, 12]. Сравнение сортов в пределах одного вида по критерию Фишера показало, что достоверность различий выборок между сортами гораздо ниже, чем между видами (табл. 2 и 3). Результаты оценки показателя точности опыта (P) в связи со значительными значениями коэффициента

**Активность ассоциативной азотфиксации (адетиленредукции)  
коллекционных образцов пшеницы ( $\lg \text{нг C}_2\text{H}_4/\text{г корней} \cdot \text{сут}^{-1}$ )**

№ образца по каталогу ВИР	Количество образцов	X	S	w, %	P. %	Сравнение по критерию Фишера			
						F	QF, %	td	P <sub>td</sub> %
<b>T. monococcum (геном A)</b>									
23032*	14	1,32	0,59	44,34	11,85				
20744	20	1,36	0,81	59,29	13,26	1,90	92,66	0,16	10,80
25968	9	1,24	0,63	50,42	16,81	1,14	52,82	0,38	23,11
20589	28	1,79	1,03	57,85	10,93	3,10	98,70	1,80	92,09
21308	12	2,35	0,20	8,37	2,42	8,92	99,98	5,91	100,00
18105	10	2,71	0,24	8,93	2,82	5,87	99,64	7,61	100,00
<b>T. dicoccoides (геном AB)</b>									
5196*	15	2,2	0,63	31,04	8,02				
5201	17	1,89	0,65	34,09	8,27	1,06	54,23	0,54	38,45
20403	16	2,15	0,31	14,46	3,62	4,07	99,46	0,70	50,98
41965	17	2,47	0,71	28,75	6,97	1,29	67,87	1,92	89,78
<b>T. timopheevii (геном AG)</b>									
27802*		2,59	0,20						
29537		2,42	0,23			Не определяли			
29558		2,30	2,58						
<b>T. dicoccum (геном AB)</b>									
859*	12	2,04	0,57	27,90	8,05				
6249	8	1,90	0,25	13,18	4,66	5,14	98,75	0,69	49,90
6392	17	2,39	0,31	13,05	3,17	3,32	98,53	1,90	92,88
6387	8	2,05	0,29	14,37	5,08	3,74	97,09	0,04	3,36
5154	6	3,31	0,79	26,74	10,92	2,33	95,90	2,21	98,98
<b>T. militinae (геном AG)</b>									
46007		2,78	0,52			Не определяли			
<b>T. durum (геном AB)</b>									
22636		2,47	0,18			Не определяли			
<b>T. vavilovii (геном ABD)</b>									
30085*	7	2,66	0,34	Не опр.	4,78				
33770	7	2,47	0,12	4,97	1,88	7,50	98,65	1,30	78,22
51760	10	2,52	0,71	28,33	8,96	4,49	95,93	0,53	39,34
<b>T. aestivum (геном ABD)</b>									
11370*	10	2,17	0,15	7,04	2,23				
1906	10	3,30	0,97	29,24	9,25	40,32	100,00	3,51	99,75
43920	7	3,02	0,93	30,93	11,69	Не определяли			
46004	8	2,60	0,76	29,35	10,38	25,26	99,99	1,52	85,29
46006	6	3,49	0,91	26,17	10,68	35,96	100,00	3,30	99,47
<b>T. timonovum (геном AAGG)</b>									
43065	8	2,29	0,25			Не определяли			

\* За контроль принята активность ААФ данного образца в пределах данного вида пшеницы при сравнении выборок по критерию Фишера.

вариации *nis*-признака у многих сортов превышали 5 % (табл. 3). Показатель точности опыта можно несколько уменьшить при более четкой стандартизации условий. Основная же причина большой вариабельности ассоциативной азотфиксации, на наш взгляд, заключается в природе самого явления. Образование азотфиксирующей ассоциации между небобовыми растениями и diaзотрофами осуществляется в несколько этапов: продуцирование растением питательных субстратов для бактерий и веществ-активаторов, хемотаксис бактерий к корню, адсорбция

(адгезия) бактерий на корнях, инфекция, обмен метаболитами, сигналами и т. д. Ассоциация может нарушаться на любом из перечисленных этапов. Влияет на этот процесс даже незначительное изменение температуры [20]. К сожалению, природа взаимодействия небобовых растений и азотфиксирующих бактерий в ассоциации не изучена, поэтому причины большой изменчивости *nis*-признака до сих пор неясны.

Следует обратить внимание на наличие в пределах одного сорта пшеницы растений, обладающих нулевой *nis*-активностью, что отмечалось и другими исследователями [20], но подобный факт пока не получил объяснения. Поскольку вносимая популяция почвенных бактерий во всех случаях в нашем опыте была стандартной, то очевидно, что существование ассоциаций «растение — бактерии» с нулевой активностью азотфиксации определяется генотипом растения-хозяина.

Исследованные выборки, состоящие из озимых и яровых сортов, по активности азотфиксации (ацетиленредукции) достоверно не различались (табл. 4).

Анализ *nis*-признака у 20 моносомных линий сорта Саратовская 46 (геном ABD) указывает, что данный признак контролируется несколь-

Таблица 4

Активность ассоциативной азотфиксации у озимых и яровых сортов пшеницы ( $\lg \text{нг C}_2\text{H}_4/\text{г корней}\cdot\text{сут}^{-1}$ )

Группа сортов	Количество сортов	Количество растений	X	S	W, %	P, %	Сравнение по критерию Фишера			
							F	QF, %	td	P <sub>td</sub> , %
Озимые *	8	62	2,58	0,76	29,61	3,76				
Яровые	15	330	2,20	0,84	38,20	2,49	1,21	81,34	3,39	99,87

\* За контроль принята группа озимых сортов при сравнении выборок по критерию Фишера.

кими генами. В среднем большие нарушения ассоциативной азотфиксации наблюдаются у линий 1А—7А. Исходя из этого можно судить о ведущей роли генома А в *nis*-активности у гексаплоидных пшениц. По влиянию геномов на *nis*-признак моносомные линии можно расположить в следующий ряд: А>D>В. Линия 3D не была исследована из-за поражения всех проростков грибной инфекцией. Абсолютное значение ААФ было самым низким у линии 6D.

Распределение *nis*-признака у пшениц с различным уровнем плоидности близко к нормальному, за исключением октоплоидов (распределение Максвелла). Видовое распределение *nis*-признака у пшениц следующее: у 4 видов — *T. monococcum*, *T. dicoccum*, *T. dicoccoides*, *T. timopheevii* — нормальное, у *T. militinae* — сходно с распределением Максвелла, у остальных 4 видов — близко к теоретическому распределению Парето (табл. 2). Нормальное распределение *nis*-активности свойственно большинству исследованных сортов, что свидетельствует о гетерогенности популяций пшеницы по этому признаку. Популяционный полиморфизм по признаку азотфиксации характерен и симбиотическим системам [2, 6—8], что позволяет вести направленную селекцию на данный признак.

### Заключение

Увеличение плоидности до гексаплоидного уровня сопровождается достоверным повышением у пшениц *nis*-активности. Наследование *nis*-признака у гексаплоидных пшениц носит полигенный характер. Его распределение в пределах одного сорта приближается к нормальному. Наблюдается значительная гетерогенность сортовых популяций по призна-

ку ассоциативной азотфиксации. Достоверных различий по активности ассоциативной азотфиксации между яровыми и озимыми не обнаружено. Максимальный уровень nis-признака зарегистрирован у вида *T. aestivum*.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Берлянд-Кожевников В. М., Дорофеев В. Ф. Некоторые особенности эволюции культурных видов пшеницы. — С.-х. биология, 1977, т. 12, № 6, с. 860—868. — 2. Проворов Н. А., Симаров Б. В., Зарецкая А. Н. и др. Изменчивость культурных видов люцерны по способности к симбиотической азотфиксации. — С.-х. биология, 1987, № 6, с. 29—32. — 3. Родынюк И. С. Влияние генотипа пшеницы на формирование эффективных ассоциаций с азотфиксирующими микроорганизмами. — Бюл. ВНИИСХМ. — Л., 1985, № 42, с. 54—56. — 4. Садыков Б. Ф., Ильина Л. Б., Багаутдинов Ф. Я., Мишибаев Ф. Р. Активность ассоциативной азотфиксации в ризосфере пшеницы. — С.-х. биология, 1986, № 12, с. 34—36. — 5. Симаров Б. В., Тихонович И. А. Генетические основы бобово-ризобиального симбиоза. — В кн.: Минеральный и биологический азот в земледелии СССР. — М.: Наука, 1985, с. 165—174. — 6. Сметанин Н. И., Родынюк И. С., Шумный В. К. Популяционный полиморфизм бобовых по уровню симбиотической азотфиксации. — Изв. СО АН СССР. Сер. биол., 1985, вып. 3, с. 38—41. — 7. Сметанин Н. И., Родынюк И. С., Шумный В. К. Сортной полиморфизм люцерны по азотфиксирующей способности. — С.-х. биология, 1987, № 6, с. 25—28. — 8. Сметанин Н. И., Родынюк И. С., Соколов В. А., Шумный В. К. Полиморфизм видов гороха по азотфиксирующей активности. — С.-х. биология, 1987, № 9, с. 40—43. — 9. Умаров М. М. Значение несимбиотической азотфиксации в балансе азота в почве (обзор). — Изв. АН СССР. Сер. биол., 1982, № 1, с. 92—105. — 10. Умаров М. М. Ассоциативная азотфиксация: проблемы и перспективы. — Бюл. ВНИИСХМ, 1985, № 42, с. 9—13. — 11. Умаров М. М., Шабаев В. П., Смолин В. Ю. Роль атмосферного азота в питании небобовых культур. — Изв. АН СССР. Сер. биол., 1987, № 2, с. 254—263. — 12. Avivi Y., Feldman M. — *Isr. J. Bot.*, 1982, vol. 31, p. 1—4. — 13. Bouton J. H., Smith R. L., Schank S. C. a. o. — *Crop. Sci.*, 1979, vol. 19, p. 12—16. — 14. Bouton J. H., Albrecht S. L., Zuberer D. A. — *Field Crops. Res.*, 1985, vol. 11, p. 131—140. — 15. Dobereiner J. — In: *Genetics control of diversity of plants* / ed. A. Muhamed, R. Aksel a. R. C. von Borstel. — N. Y.: Plenum/ Press, 1977, p. 325—334. — 16. Ela S. W., Anderson M. A., Brill W. J. — *Plant Physiol.*, 1982, vol. 70, p. 1564—1567. — 17. Fujii T., Sano G., Iyama S., Hirota G. — *Ann. Rep. Nat. Inst. of Genet.*, N 29. Res. carried out in 1978, p. 101—103. — 18. Fujii T., Sano G., Iyama S. — *Japan J. Breed. Suppl. Tokyo*, 1979, vol. 29, N 2, p. 64—65. — 19. Hirota Y., Fujii T., Sano Y., Iyama S. — *Nature*, 1978, vol. 276, p. 416—417. — 20. Jain D. R., Rennie R. J. — *Can. J. Microbiol.*, 1986, vol. 32, N 4, p. 285—288. — 21. Neal J. L., Larson R. I. — *Soil Biol. Biochem.*, 1976, vol. 8, p. 151—155. — 22. Rennie R. J., Larson R. I. — *Can. J. Bot.*, 1979, vol. 57, p. 2771—2775. — 23. Rennie R. J. — In: *Induced mutations as a tool for crop plant improvement*. — Vienna: IAEA, 1981, p. 293—321. — 24. Rennie R. J. — *Canad. Agr.*, 1983, vol. 29, N 3/4, p. 4—9. — 25. Thomas-Bauzon D., Weinhard P., Villenkort P., Balandreau J. — *Can. J. Microbiol.*, 1982, vol. 28, N 8, p. 922—928.

*Статья поступила 22 декабря 1987 г.*

## SUMMARY

Associative nitrogen fixation (acetylene reduction) activity in 9 wheat species of *Triticum* genus differing in ploidy rate and genome composition was studied. Polygenic mode of nis-character inheritance in hexaploid wheats (ABD genom) has been discovered.