

Изучение симбиотических признаков – нодуляции и активности азотфиксации – у разных сортов вики яровой (*Vicia sativa* L.)

К.К. Сидорова¹✉, А.В. Гончарова²

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

Вика яровая (*Vicia sativa* L.) – одна из основных однолетних кормовых бобовых культур России. Как и другие виды бобовых, она способна вступать в симбиоз с клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium* и фиксировать молекулярный азот из воздуха. Это ведет к обогащению почвы азотом и обеспечивает произрастание культуры на бедных почвах. У вики симбиотические гены пока не установлены, поэтому селекция этой культуры ограничивается оценкой селекционного материала по nodуляции и очень редко – по активности азотфиксации с использованием ацетиленового метода. В работе изложены результаты исследований nodуляции и активности азотфиксации у четырех сортов вики яровой селекции СибНИИРС. В качестве контроля в опыт были включены два сорта кормового гороха (пелюшки) – Дружная и стародавний сорт Фаленская 42. Активность азотфиксации определяли ацетиленовым методом по активности нитрогеназы. Установлены существенные сортовые различия по nodуляции и азотфиксации, которую определяли на газовом хроматографе «Цвет 500» (Россия). У сортов вики активность нитрогеназы варьировала от 2811 до 6890 C₂H₄ нмоль/растение/ч. Выделены два из них, Ленская 15 и Приобская 25, с повышенной nodуляцией и активной азотфиксацией. Nодуляция у двух изученных сортов кормового гороха (пелюшки) была слабее, чем у вики. Однако активность азотфиксации была выше у гороха.

Ключевые слова: вика; *Vicia sativa* L.; nodуляция; азотфиксация; продуктивность.

The study of symbiotic traits – nodulation and activity of nitrogen fixation – in different cultivars of spring vetch (*Vicia sativa* L.)

K.K. Sidorova¹✉, A.V. Goncharova²

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Siberian Research Institute for Plant Production and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Common vetch *Vicia sativa* L. is one of the major annual fodder legume crops in Russia. Like other legumes, it can enter into symbiosis with nodule bacteria of the genus *Rhizobium* and to fix molecular nitrogen from the air. This ability contributes to the enrichment of soils with nitrogen and the possibility of growing crops on poor soils. Vetch symbiotic genes have not yet been identified, so the breeding of this crop is confined to the assessment of breeding material with regard to nodulation and very rarely to the activity of nitrogen fixation measured by the acetylene method. This paper presents the results of studies of nodulation and nitrogen-fixing activity that we conducted with four spring vetch cultivars raised at the Siberian Research Institute for Plant Industry and Breeding. Two varieties of forage pea, namely Druzhnaya and traditional cv. Falenskaya 42, were taken as references. The activity of nitrogen fixation was assessed from nitrogenase activity, assayed by the acetylene method. The study revealed significant varietal differences in nodulation and nitrogen fixation, determined on a gas chromatograph Tsvet 500, Russia. The nitrogenase activity rates in vetch cultivars under study varied from 2811 to 6890 C₂H₄ nmol/plant/h. Two of them, Lena and Priobskaya 25, were prominent in high nodulation nitrogen fixation rates. Nodulation in the two reference pea cultivars was weaker than in vetch. However, their nitrogen fixation activities were higher.

Key words: vetch; *Vicia sativa* L.; nodulation; nitrogen fixation; performance.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Сидорова К.К., Гончарова А.В. Изучение симбиотических признаков – nodуляции и активности азотфиксации – у разных сортов вики яровой (*Vicia sativa* L.). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(3):344-347. DOI 10.18699/VJ16.159

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Sidorova K.K., Goncharova A.V. The study of symbiotic traits – nodulation and activity of nitrogen fixation – in different cultivars of spring vetch (*Vicia sativa* L.). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(3):344-347. DOI 10.18699/VJ16.159

ORIGINAL ARTICLE

Received 28.10.2015 г.

Accepted for publication 16.05.2016 г.

© AUTHORS, 2016

В настоящее время вика яровая (посевная) (*Vicia sativa* L.) занимает ведущее место в структуре однолетних бобовых культур Российской Федерации. Хорошая урожайность и высокие кормовые достоинства зеленой массы, сена, возможность разностороннего использования в чистом виде и в качестве высокобелкового компонента в смешанных посевах (кормосмеси), накопление азота в почве при ее использовании в севооборотах определяют ее хозяйственную ценность. В Западной Сибири яровая вика является одним из основных высокобелковых компонентов однолетних трав. Урожайность вико-овсяных смесей составляет 360–650 ц/га зеленой массы и 20–25 ц/га сбалансированного по белку зернофуража (Васякин, 2002).

По кормовым достоинствам зеленой массы вика заметно превосходит горох. Она содержит меньше клетчатки, долго не грубеет и охотно поедается сельскохозяйственными животными. В сухом веществе зеленой массы, скошенной в период цветения, содержится 20–25 % протеина. Белок растительной массы богат незаменимыми аминокислотами, в том числе лизином и триптофаном, и отличается высоким коэффициентом перевариваемости (до 83 %).

На корнях вики, как и у всех бобовых культур, образуются клубеньки, в клетках которых находятся клубеньковые бактерии, и она способна вступать в симбиоз с клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium* и фиксировать молекулярный азот воздуха (Jorjín, Imperial, 2015). Это способствует обогащению почвы азотом, поэтому вика улучшает плодородие почвы и является хорошим предшественником для последующих культур. С пожнивными остатками и корнями вики в почве накапливается от 50 до 100 кг азота на 1 га. (Васякин, 2002).

Все клубеньковые бактерии, вступающие в симбиоз с бобовыми культурами, по классификации Л.М. Доросинского (1970) относятся к роду *Rhizobium*. Этот род делится на 11 видов, каждый из них способен инфицировать одну или несколько бобовых культур. Бактерии *Rhizobium leguminosarum* инфицируют пять видов бобовых культур: горох, вику, кормовые бобы, чину, чечевицу.

Исследования по азотфиксации у бобовых сосредоточены в основном на горохе посевном *Pisum sativum* L. (Sagan et al., 1994; Сидорова, Шумный, 1999; Назарюк и др., 2004; Тихонович, Проворов, 2011). До настоящего времени в России отмечено незначительное количество исследовательских работ по азотфиксации вики, в лучшем случае исследователи определяли только число и массу корневых клубеньков (кг/га) и отмечали сортовые различия по этим признакам (Вавилов, Посыпанов, 1983; Посыпанов, 1991; Посыпанов и др., 1994 и другие). Судя по литературным данным, у вики симбиотические гены пока не установлены, поэтому селекция этой культуры ограничивается оценкой селекционного материала по нодуляции и очень редко – по активности азотфиксации с использованием ацетиленового метода.

Цель данного исследования – изучить симбиотические признаки, клубенькообразование и активность азотфиксации, у разных сортов вики яровой (*Vicia sativa* L.) в сравнении с горохом (*Pisum sativum* L.).

Материалы и методы

В опыт было включено четыре сорта вики яровой селекции СибНИИРС РАСХН, относящиеся к разным разновидностям: Новосибирская (var. *immaculata*), Ленская 15 (var. *typika*), Приобская 25 (var. *pseudo-immaculata*), 4604/1-2 (var. *maculata*) (табл. 1). Для сравнения по симбиотическим показателям в опыт в качестве контроля были включены сорта кормового гороха (пелюшки) Дружная (селекции ИЦиГ СО РАН) и Фаленская 42 (Фаленская ГСС).

Растения выращивали в теплице в сосудах с керамзитом. Инокуляцию проводили в фазу «начало всходов» штаммом ризобий 250а, созданным в Институте сельскохозяйственной микробиологии РАСХН (г. Санкт-Петербург). Для питания растений использовали разработанную в ИЦиГ СО РАН схему с пониженной дозой минерального азота (60 %) в начале роста растений и полной дозой азота начиная с начала цветения. Это обусловлено тем, что минеральный азот угнетает рост и жизнедеятельность клубеньковых бактерий. Остальные элементы питания растений вносили в полной дозе от посева до анализа активности азотфиксации.

В фазу цветения определяли высоту стебля, количество клубеньков и активность азотфиксации ацетиленовым методом на газовом хроматографе «Цвет 500» (Россия). По каждому варианту опыта анализировали по 10 растений.

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали показатель наименьшей статистической разницы (НСР) между сравниваемыми вариантами (Доспехов, 2011).

Результаты

По высоте растений существенных различий между сортами образцами вики и сортом гороха Фаленская не наблюдали. Сорт гороха Дружная достоверно не отличался только от сорта вики Ленская 15. Два сорта вики, Приобская 25 и 4604/1-2, оказались самыми высокорослыми в опыте, соответственно 98,3 и 103,1 см (табл. 2).

По развитию корневой системы и нодуляции выделили сорт Ленская 15 и линию 4604/1-2 (рис. 1). У них показатель числа клубеньков на одно растение составил 390,6 и 345,0 шт. соответственно. Самая активная азотфиксация отмечена у сорта вики Ленская 15 – 6890 C_2H_4 нмоль/растение/ч (см. табл. 2).

Следует отметить, что у двух сортов вики, Ленская 15 и Приобская 25, и линии 4604/1-2 количество клубеньков на одно растение было существенно больше, чем у гороха. Однако активность азотфиксации у обоих сортов гороха была существенно выше. Это можно объяснить тем, что растения бобовых культур благодаря фотосинтезу являются источниками энергии, которая расходуется одновременно как на продукционный процесс, так и на нодуляцию и азотфиксацию, при этом площадь листьев на одно растение у вики значительно ниже, чем у гороха (рис. 2). У гороха сорта Дружная большие прилистники и пара крупных листочков. В начале цветения количество листочков увеличивается до четырех.

Стоит отметить разницу в расположении клубеньков на корнях вики и гороха. У всех сортов вики клубеньки рас-

Table 1. Characterization of common vetch (*Vicia sativa* L.) accessions

Property	Cultivar			Line
	Novosibirskaya	Lenskaya 15	Priobskaya 25	4604/1-2*
Origin	Biochemical mutant No. 1166 Tulunskaya GSS × Lgovskaya 34	Kamalinskaya 611 × Tulunskaya	Baikalskaya × G-252	Selection from a Tulunskaya GSS hybrid specimen
Zonation	1, 4, 10	11	10, 11	КСИ*
Plant height, cm	76–94	78–107	79–98	69–86
Duration of vegetation (shooting – maturation), days	78–86	81–92	80–90	76–84
Herbage, t/ha	25.8–29.3	27.2–31.4	26.2–30.0	26.0–31.4
Dry weight, t/ha	4.4–5.8	4.5–5.8	4.5–5.4	4.9–5.4
Grain yield, t/ha	2.7–3.1	2.4–2.9	2.7–3.2	2.8–3.2

* Competitive variety trial.

Table 2. Symbiosis-related traits (nodulation and nitrogen fixation) in common vetch (*Vicia sativa* L.) and pea (*Pisum sativum* L.) cultivars

Crop	Accession	Plant height at flowering, cm	Nodules per plant	Nitrogenase activity, nmol C ₂ H ₄ /h per plant
Vetch	Novosibirskaya	87.4	164.5	2811
	Lenskaya 15	85.7	390.6	6890
	Priobskaya 25	98.3	233.0	5330
	Line 4604/1-2	103.1	345.0	3799
Pea	Druzhnaya	86.9	138.8	12564
	Falenskaya 42	79.8	167.4	8347
	LSD ₀₅	7.3	59.4	596.8

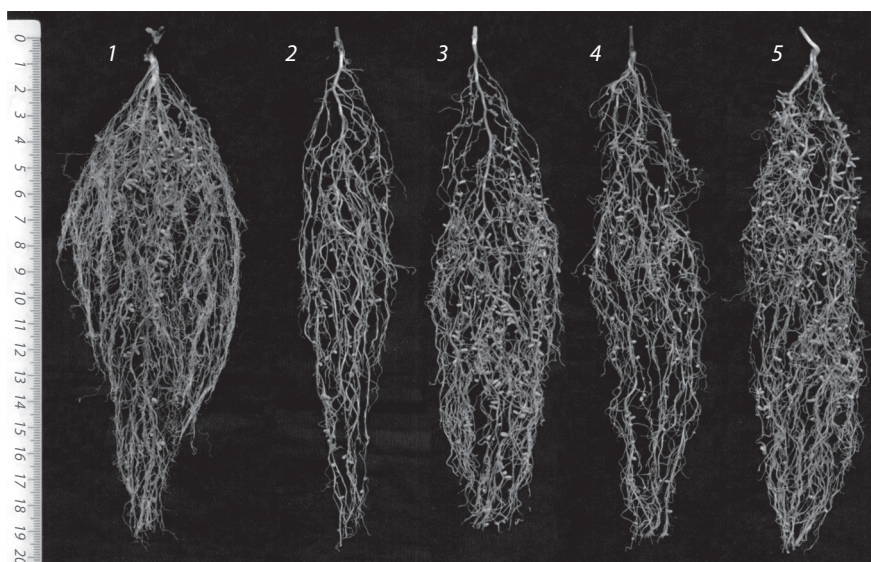


Fig. 1. (1) Druzhnaya pea roots. (2–5) Roots of vetch accessions: (2) Novosibirskaya; (3) Lenskaya 15; (4) Priobskaya 25; (5) line 4604/1-2.

пределены по всей корневой системе, а у гороха в основном на центральном корне (см. рис. 1).

Обсуждение

В ИЦиГ СО РАН создана и генетически изучена коллекция симбиотических мутантов гороха, установлены *sym*-гены и разработан метод рекуррентной селекции по созданию форм с высокой нодуляцией и активной азотфиксацией (Сидорова, Шумный, 2003; Сидорова и др., 2012). Это позволило провести сравнительный анализ по симбиотическим признакам, нодуляции и азотфиксации, сортов вики (*Vicia sativa* L.) и гороха кормового (пелюшки) (*Pisum sativum* L.). Изученные признаки имеют большое значение при оценке каждого сорта по накоплению азота в почве, который используется последующей культурой в севообороте.

В проведенных нами исследованиях выявлены сортовые различия по нодуляции и активности азотфиксации у вики и гороха (см. табл. 2). По симбиотическим признакам у сортов вики выявлены сортовые различия. По количеству клубеньков и активности нитрогеназы выделяется сорт вики Ленская 15. У него число клубеньков на одно растение было равно 390,6; активность нитрогеназы – 6890 C_2H_4 нмоль/растение/ч. Самые низкие показатели по симбиотическим признакам установлены у вики сорта Новосибирская. По продуктивности и признакам азотфиксации внимания заслуживает линия 4604/1-2, имеющая хорошую продуктивность, короткий вегетационный период и высокие симбиотические показатели, особенно нодуляция. По активности нитрогеназы оба сорта кормового гороха (пелюшки), Дружная и Фаленская 42, существенно превысили показатели сортов вики по этому признаку. Это обусловлено тем, что у гороха больше листовая площадь и, следовательно, значительно выше эффективность фотосинтеза. При этом было показано, что у кормового гороха количество корневых клубеньков меньше, чем у вики, но активность азотфиксации была выше у гороха. Это можно объяснить тем, что площадь листьев на одно растение у вики значительно меньше, чем у гороха.

Не менее важна оценка сорта по продуктивности. Для продукционного процесса и симбиотической азотфиксации растение использует один и тот же источник энергии – фотосинтез. Благодаря фотосинтезу растения являются источником энергии, которая расходуется как на продукционный процесс, так и нодуляцию. Создать сорт, у которого оба показателя были бы высокими, довольно трудно. По активности азотфиксации внимания селекционеров заслуживают два сорта вики, Ленская 15 и Приобская 25.

Таким образом, проведенные исследования позволили выделить сорт вики Ленская 15 и линию 4604/1-2 в качестве потенциальных доноров при селекции новых сортов вики с повышенной активностью азотфиксации.



Fig. 2. Leaves: (1) Druzhnaya pea; (2) Lenskaya 15 vetch; (3) Novosibirskaya vetch.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0005.

The authors are grateful to M.N. Glyanenko and T.M. Mishchenko for assistance in experimental work.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Dorosinsky L.M. Klubenkovye bakterii i nitrogin [Nodule Bacteria and Nitrogin]. Leningrad, Kolos, 1970.
- Dospekhov B.A. Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezultatov issledovaniy) [Technique of the Field Experiment (with Fundamentals of the Statistical Processing of Results)]. Moscow, AI'yans, 2011.
- Jorin B., Imperial J. Population genomics analysis of legume host preference for specific rhizobial genotypes in the *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* symbioses. *Molecular plant-microbe interactions*. 2015;28(3):310-318.
- Nazaryuk V.M., Sidorova K.K., Shumny V.K., Klenova M.I. Role of macrosymbiont genotype in the assimilation of nitrogen from the soil and air. *Doklady RAN = Proceedings of the Russian Academy of Sciences*. 2004;394(1):139-141.
- Posypanov G.S. Metody izucheniya biologicheskoy fiksatsii azota vozdukh [Methods of Studying the Biological Fixation of Atmospheric Nitrogen]. Moscow, Agropromizdat, 1991.
- Posypanov G.S., Khramov V.K., Krivtsov I.I., Debelyi G.A. Features of formation of the symbiotic apparatus and seed production in different common vetch varieties. *Izvestiya Timiryazevskoy sel'skokhozyaystvennoy akademii = Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 1994;1:205-209.
- Sagan M., Huguet T., Duc G. Phenotypic characterization and classification of nodulation mutants of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Sci*. 1994;100:59-70.
- Sidorova K.K., Goncharova A.V., Goncharov P.L., Shumny V.K. Breeding of pea for improved nitrogen fixation with the use of symbiotic mutants. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2012;1:105-109.
- Sidorova K.K., Shumny V.K. Genetics of symbiotic nitrogen fixation and the principles of selection in self-pollinating leguminous cultures exemplified by *Pisum sativum* L. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 1999;35(11):1550-1557.
- Sidorova K.K., Shumny V.K. Creating and genetic study of the collection of symbiotic mutants of pea. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 2003;39(4):501-509.
- Tikhonovich I.A., Provorov N.A. Agricultural microbiology as a basis for sustainable agricultural production: fundamental and applied aspects. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2011;3:3-9.
- Vasyakin N.I. Zernobovoye kulyury v Zapadnoy Sibiri [Legumes in Western Siberia]. Novosibirsk, Siberian Branch of the Russian Academy of Agricultural Sciences, Altai Research Institute of Agriculture and Breeding, 2002.
- Vavilov P.P., Posypanov G.S. Bobovoye kulyury i problema rastitelnogo belka [Legumes and the Problem of Vegetable Protein]. Moscow, Rosselkhozizdat, 1983.