

## ВИЗНАЧЕННЯ І УСПАДКОВУВАНІСТЬ АКТИВНОСТІ АЗОТФІКАЦІЇ І НОДУЛЯЦІЇ У *MEDICAGO SATIVA* І *RHIZOBIUM MELILOTI*

На формування і успадковуваність досліджених ознак найбільше впливали фактори неадитивної взаємодії симбіонтів і рослин *Medicago sativa*, досліджені штами *Rhizobium meliloti* впливали найменше. Ризобії впливали на успадковуваність азотфікації і нодуляції більше, ніж на кількість утворених бульбочок та їх азотфікацію.

### Постановка проблеми

Центральне місце у формуванні бобово-ризобіального симбіозу займає процес фікації бульбочковими бактеріями молекулярного азоту, який потім засвоюється рослиною–господарем і залежить від генотипів обох симбіопартнерів. Виникнення симбіозу – складний багатоступінчастий процес, який забезпечується постійною взаємодією генів макро- і мікро-симбіонтів та їх молекулярних продуктів [9, 16]. Приклади специфічної взаємодії між лініями бульбочкових бактерій і рослин–господарів свідчать про наявність комплементарності генів цієї взаємодії [4].

На стадіях передінфекції, інфекції, формування і функціонування бульбочки проявляються особливості геному кожного із симбіонтів у залежності від зовнішнього середовища і адаптивних здібностей партнерів. Здійснення симбіозу можливе при генетичній сумісності видів, сортів і генотипів бобових рослин із штамми *Rhizobium* [5]. Активність азотфікації, яку проявляють симбіотичні системи, суттєво залежить від генотипів штамів [7, 10, 14].

Показано, що рівень фікації азоту і бульбочкоутворення залежить від комплементарної специфічної взаємодії рослин і бактерій (неадитивний фактор) [4, 5, 7, 13, 18, 19] і контролюється в основному рослиною–господарем [1, 2, 3, 5, 8], що доведено вегетаційними дослідженнями і біометричними методами аналізу. Інтенсивність симбіотичної азотфікації з боку рослини визначається інтенсивністю притоку продуктів фотосинтезу

до коренів і тому залежить від рослини більшою мірою, ніж від мікросимбіонта [2]. Активна роль рослин в бобово-ризобіальному симбіозі доводиться великою кількістю робіт [3, 12, 13]. Симбіотична активність залежить від видових і сортових особливостей рослин [15], рівня мінливості популяції за азотфіксацією і бульбочкоутворенням [3].

Рівень нітрогеназної активності неоднаковий у різних екземплярів рослин, сортів і видів, що свідчить про спадкову мінливість і гетерогенність рівня азотфіксації у рослин. Відомо, що рівень мінливості симбіотичних ознак рослин значною мірою визначає прояв активності ризобій і результативність селекції високоефективних штамів [7]. Кількість бульбочок на коренях в значній мірі визначається фактором сім'ї.

Адитивна неспецифічна дія генотипів рослин і бактерій в середньому приблизно рівні між собою і визначає біля 25 % від загального 100 % варіювання симбіотичної активності [7]. При узагальненні даних, отриманих на різних видах бобових, найбільш мінливим виявився вклад специфічного фактора взаємодії партнерів у визначенні симбіотичної активності, який коливається від 0 до 73,8 %. Внесок партнерів при взаємодії залежить від генотипів симбіонтів в експерименті [7]. “Неконтрольовані” фактори оточуючого середовища значно впливають на бобово-ризобіальний симбіоз [6]. Реакція генотипів на інокуляцію, кількість і маса бульбочок, нітрогеназна і симбіотична активність в польових і лабораторних умовах в значному ступені чутливі до багатьох факторів і залежать від коливання зовнішнього середовища [2], погодних умов, стресових факторів і складу ризосферної мікрофлори, року вирощування, окультуреності ґрунтів, інших модифікуючих факторів середовища. Активність нітрогенази залежить від адаптивних здібностей обох симбіопартнерів. Дія адитивних і неадитивних факторів симбіонтів на азотфіксувальну ефективність суттєво варіює від досліда до досліду [7]. Висів насіння в різні строки, оточуюче середовище [3], відмінності за роками викликають суттєві відмінності у кількості утворених бульбочок та їх нітрогеназній активності.

Варіабельність ознак симбіозу в польових умовах значно більша, ніж у мікровегетаційному досліді – це показує, що зовнішні умови значно впливають на ознаки симбіозу. Найбільше “неконтрольована” мінливість у загальному варіюванні симбіотичних ознак притаманна люцерні – надзвичайно варіабельній за здатністю до симбіозу перехреснозапильній культурі. “Неконтрольоване” варіювання часто впливає на симбіотичну ефективність більше, ніж генотипи рослин і бактерій [7]. “Неконтрольовані” фактори часто обумовлюють більше половини загального варіювання симбіотичної активності. Одним з джерел такого варіювання є внутрішньосортова мінливість бобових культур за ознаками симбіозу [6, 7, 17]. Значно меншими величинами характеризується вклад “неконтрольованих” чинників у визначенні симбіозу у здатних до самозапилення культур. Часто частка дії макросимбіонта на величину азотфіксувальної активності в 1,5–2 рази перевищувала дію бактерій [7].

Недослідженими залишаються кількісні величини впливу генотипів інбредних лінійних і гібридних рослин люцерни та бульбочкових бактерій на формування азотфіксації і бульбочкоутворення та показники їх успадкованості.

*Завдання дослідження.* Для успішного проведення селекції бобових рослин і ризобій на підвищення симбіотичної активності необхідно знати величину відносного вкладу партнерів в контроль параметрів симбіотичної системи та вплив неконтрольованих чинників середовища на цей процес; встановити величину успадкованості азотфіксації і бульбочкоутворення для проведення успішної селекції за цими ознаками; визначити високоефективні комплементарні пари генотипів люцерни посівної з штамми бульбочкових бактерій.

*Об'єкти та методи досліджень.* У власній роботі використовували штамми 34 (отриманий шляхом транспозонового мутагенезу), 425a (штам-еталон) і М4 (отриманий шляхом міжродової кон'югації) *Rhizobium meliloti*. Даними бульбочковими бактеріями інокулювали інбредні рослини ліній *Medicago sativa* L. різного походження і отримані від них гібриди при неповних поліалельних схрещуваннях  $F_1$  і  $F_2$ . Нітрогеназну активність визначали ацетиленовим методом [10]. Вегетаційні досліді проводили в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України протягом трьох років.

### Результати досліджень

Аналіз трирічних даних однофакторних дисперсійних аналізів за відносними вкладами генотипів люцерни і бульбочкових бактерій в детермінації активності азотфіксації і бульбочкоутворення показав, що вклад макросимбіонтів, особливо у симбіозі із штамом 425a, є достовірним, на відміну від мікросимбіонтів, і сягає для лінійних і гібридних рослин 12,8–97,4 % для ацетиленредуктазної активності і 13,3–97,0 % для кількості утворених бульбочок. Найбільші внески за двофакторними аналізами належать специфічній неадитивній взаємодії симбіопартнерів, яка сягає 21,5–33,1 % для азотфіксації і 5,7–50,7 % для бульбочкоутворення. Адитивний вплив рослини-господаря сягає 4,9–18,5 % для активності нітрогенази і 5,1–16,1 % для бульбочкоутворення. Вплив ризобій на інтенсивність азотфіксації сягав до 3,0 %, нодуляції до 18,7 % (табл. 1).

Відносні вклади генотипів фітосимбіонтів у симбіотичну азотфіксацію закономірно зменшуються зі збільшенням варіювання фактору штама за нітрогеназною і нодуляційною активністю в два-три рази. Внесок лінійних рослин щодо гібридів часто недостовірний і малий, що можна пояснити інбредною депресією. Вплив досліджених штамів 34, 425a і М4 на значення азотфіксації і нодуляції була незначною і недостовірною через незначне варіювання досліджуваних ознак, що можна пояснити подібністю

даних штамів за фізіологічною і генетичною дією. Дія ризобію на кількість утворених бульбочок дещо більша, ніж на активність азотфіксації.

**Таблиця 1. Відносні внески генотипів симбіонтів у визначенні кількості бульбочок і азотфіксації ліній і гібридів *Medicago sativa* L. в симбіозі з *Rhizobium meliloti* за одно- і двофакторним дисперсійним аналізом, %**

Ознака	Однофакторний аналіз		Двофакторний аналіз		
	Бактерії	Рослини	Бактерії	Рослини	Взаємодія симбіонтів
Кількість бульбочок	14,2–28,9	13,3–97,0	3,3–6,4	5,1–16,1	5,7–50,7
Азот-фіксація	–	23,7–97,4	3,0	4,9–18,5	21,5–33,1

Дія рослин на коефіцієнт успадковуваності азотфіксувальної активності (в широкому змісті слова) за однофакторним аналізом була значною і сягала 25,8–99,7 %, на бульбочкоутворення – 2,7–97,3 %. Роль досліджених генотипів ризобій на успадковуваність достовірно не впливала. Варіювання за штамом зменшувало успадковуваність азотфіксації і нодуляції в два-чотири рази. За двофакторними аналізами сумарний показник успадковуваності азотфіксації сягав 27,9–71,6 %; внесок рослин досягав 71,6 %, бактерій – 27,9 %, взаємодія партнерів – 68,6 %. Загальний показник успадковуваності бульбочкоутворення сягав 2,9–93,5 %; внесок рослин сягав 86,8 %, бактерій – 58,4 %, взаємодії – 87,3 %. Отже генотипи досліджених штамів ризобій суттєво впливали на успадковуваність азотфіксації і нодуляції (табл. 2).

**Таблиця 2. Варіювання коефіцієнтів успадковуваності кількості бульбочок і азотфіксації ліній і гібридів *Medicago sativa* L. в симбіозі з *Rhizobium meliloti* за одно- і двофакторним дисперсійним аналізом, %**

Ознака	Однофакторний аналіз		Двофакторний аналіз		
	Батьківська форма	Материнська форма	Рослини	Бактерії	Взаємодія симбіонтів
Кількість бульбочок	25,3–99,9	2,7–99,6	86,8	43,7–58,4	87,3
Азот-фіксація	22,1–99,7	50,3–97,3	49,5–71,6	22,0–27,9	35,7–68,6

На значення успадковуваності бульбочкоутворення штам бактерій впливає сильніше, ніж на азотфіксацію, як у досліді за відносним внескам генотипів симбіонтів. Отримані дані свідчать, що інтенсивність азотфіксації та її успадковуваність більшою мірою залежить від генотипа рослин та комплементарної взаємодії рослин і бактерій. У формуванні бульбочок, їх кількості, роль бактерій окремо і у взаємодії з рослинами збільшується. Це демонструється тим, що показники успадковуваності за штамми різнилися сильніше за бульбочкоутворенням, ніж за азотфікса-

цією, але недостовірно. При збільшенні фактора варіювання генотипу бактерій значення успадкованості досліджених ознак зменшується у два-три рази.

### Висновки

Достовірні показники внесків і коефіцієнтів успадкованості азотфіксації і бульбочкоутворення одержано в дослідях з високоактивними за азотфіксацією і нодуляцією лініями. Внесок материнської і батьківської форм рослин у формування досліджених ознак достовірно не відрізняються. Значною є комплементарна взаємодія макро- і мікросимбіонтів у визначенні азотфіксації і нодуляції, що необхідно враховувати у паралельній селекції рослин і бактерій на підвищення ефективності симбіозу.

### Перспективи подальших досліджень

Отримані дані вказують на можливість паралельної селекції рослин і бактерій на підвищення рівня ацетиленредуктазної і бульбочкоутворювальної активностей. Для цього необхідно використовувати висококомплементарні генотипи рослин з високим рівнем симбіотичної азотфіксації і великою кількістю утворюваних бульбочок.

### Література

1. Берестецкий О. А., Тихонович И. А. Повышение эффективности биологической фиксации азота за счет селекции бобовых растений по признакам симбиоза // Докл. ВАСХНИЛ. – 1985. – № 6. – С. 9–11.
2. Волкова Т. Н., Енкина О. В., Мякушко Ю. П. и др. Соотношение роли растительного и микробного компонентов в эффективности бобово-ризобиального симбиоза // Микробиология. – 1985. – 54, № 5. – С. 857–859.
3. Натман П. С. Генетика взаимодействия бобовых растений и клубеньковых бактерий // С.-х. биология. – 1970. – 5, № 3. – С. 462–469.
4. Проворов Н. А. Происхождение и эволюция бобово-ризобиального симбиоза // Изв. АН СССР. Сер. Биол. – 1991. – № 1. – С. 77–87.
5. Проворов Н. А., Симаров Б. В. Специфичность взаимодействия клубеньковых бактерий с разными видами растений-хозяев // С.-х. биология. – 1984. – № 7. – С. 70–74.
6. Проворов Н. А., Симаров Б. В. Внутрисортная изменчивость люцерны по активности симбиоза с *Rhizobium meliloti* // С.-х. биология. – 1986. – № 12. – С. 37–41.
7. Проворов Н. А., Симаров Б. В. Генетический полиморфизм бобовых культур по способности к симбиозу с клубеньковыми бактериями // Генетика. – 1992. – 28, № 6. – С. 5–14.
8. Сметанин Н. И., Родынюк И. С., Шумный В. К. Популяционный полиморфизм бобовых по уровню симбиотической азотфиксации // Изв. СО АН СССР. Сер. Биол. Наук. – 1985. – Вып. 3, № 18. – С. 38–41.

9. *Тихонович И. А., Проворов Н. А.* Пути использования адаптивного потенциала систем “растение–микроорганизм” для конструирования высокопродуктивных агрофитоценозов // С.-х. биология. – 1993. – № 5. – С. 36–46.
10. *Чундерова А. И.* О генетике бобово-ризобияльного симбиоза // С.-х. биология. – 1981. – 16, № 3. – С. 402–406.
11. *Чундерова А. И.* Оценка сортов бобовых растений по эффективности симбиоза с клубеньковыми бактериями методом ацетиленовой пробы // С.-х. биология. – 1981. – 16, № 3. – С. 476–477.
12. *Caetano-Anolles G., Gresshoff P. M.* Plant genetic control of nodulation // Annu. Rev. Microbiol. – 1991. – № 45. – P. 345–382.
13. *Dazzo F. B., Gardiol A. F.* Host-specificity in Rhizobium-legume interactions // Genes involved microbe-plant interact. – New York: Acad. press, 1984. – P. 3–131.
14. *Hardarson G.* Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation // Plant and Soil. – 1993. – 152, № 1. – P. 1–10.
15. *Holl F. B.* Plant genetics: manipulation of the host // Canad. J. Microbiol. – 1983. – 29, № 8. – P. 945–953.
16. *Marx J. L.* How rhizobia and legumes get it together // Science. – 1985. – 230, № 4722. – P. 157–158.
17. *Mytton L. R., Brockwell J., Gibson A. H.* The potential for breeding an improved lucerne-Rhizobium symbiosis. 1. Assessment of genetic variation // Euphytica. – 1984. – 33, № 2. – P. 401–410.
18. *Provorov N. A., Samarov B. V.* Genetic variation in alfalfa, sweet clover and fenugreek for the activity of symbiosis with *Rhizobium meliloti* // Plant Breeding. – 1990. – 105, № 2. – P. 300–310.
19. *Robertson J. G., Wells B., Brewin N. J. et al.* The legume *Rhizobium* symbiosis a cell surface interaction // J. Cell Sci. – 1985. – Sypl. 2. – P. 317–337.