

## СПЕЦИФИЧНОСТЬ СИМБИОТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ БАКТЕРИЙ РОДА *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. *VICIAE* С РАСТЕНИЯМИ ТРИБЫ VICIEAE

© С.А. Хапчаева<sup>1</sup>, С.В. Дидович<sup>2</sup>, А.Ф. Топунов<sup>1</sup>, А.Л. Мулюкин<sup>3</sup>, В.С. Зотов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва;

<sup>2</sup> ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», Симферополь;

<sup>3</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Для цитирования: Хапчаева С.А., Дидович С.В., Топунов А.Ф., и др. Специфичность симбиотических взаимодействий бактерий рода *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* с растениями трибы *Vicieae* // Экологическая генетика. – 2018. – Т. 16. – № 4. – С. 51–60. doi: 10.17816/ecogen16451-60.

Поступила: 14.09.2018

Одобрена: 11.12.2018

Принята: 25.12.2018

☼ Целью работы была оценка нодуляционной конкурентоспособности производственных штаммов на фоне аборигенных клубеньковых бактерий, а также анализ распределения генотипов штаммов, образовавших клубеньки на корнях четырёх видов растений. Объектами исследования являлись штаммы ризобий, образовавшие клубеньки на корнях растений (клубенёк-образующие единицы — КлОЕ) в результате проведенного полевого испытания с применением предпосевной обработки семян гороха (*Pisum sativum* L.), бобов (*Vicia faba* L.), чины (*Lathyrus sativus* L.) и чечевицы (*Lens culinaris* L.). При инокуляции семян использовали смесь коллекционных штаммов, выделенных из клубеньков гороха и бобов и имеющих различные сочетания хромосомных и симбиотических генотипов. Идентификацию КлОЕ проводили с помощью анализа выделенной тотальной ДНК клубенька по нескольким хромосомным маркерам: фрагменту гена *rpoB* и *hin*-региона и плазмидному (*sym*) маркеру *nodD*. Установлено, что только около 50 % клубеньков были образованы штаммами, использованными при инокуляции семян. Кроме того, были определены комбинации хромосомного и симбиотического генотипов, специфичные для ризобий — симбионтов конкретных растений-хозяев: IA-генотипа с *sym-2* — для *P. sativum*; Ia (или IB)-генотипа с *sym-4* — для *V. faba*. Результаты исследования создают предпосылки для подбора пар макро- и микросимбионтов с целью повышения эффективности микробно-растительных систем, в которых характер симбиотических взаимодействий определяет продуктивность партнеров.

☼ **Ключевые слова:** *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*; *Pisum*; *Vicia*; *Lathyrus*; *Lens*; *rpoB*; *hin*-регион; *nodD*; специфичность.

## SPECIFICITY OF THE SYMBIOTIC INTERACTION OF BACTERIA OF THE GENUS *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. *VICIAE* WITH PLANTS OF THE TRIBE VICIEAE

© S.A. Khapchaeva<sup>1</sup>, S.V. Didovich<sup>2</sup>, A.F. Topunov<sup>1</sup>, A.L. Mulyukin<sup>3</sup>, V.S. Zotov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

<sup>2</sup> Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol, Russia;

<sup>3</sup> S.N. Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

For citation: Khapchaeva SA, Didovich SV, Topunov AF, et al. Specificity of the symbiotic interaction of bacteria of the genus *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* with plants of the tribe *Vicieae*. *Ecological genetics*. 2018;16(4):51-60. doi: 10.17816/ecogen16451-60.

Received: 14.09.2018

Revised: 11.12.2018

Accepted: 25.12.2018

☼ The estimation of nodulation competitiveness of industrial strains against the native nodule bacteria and also the analyses of distribution of strain's genotypes which formed nodules on roots of 4 plant species was the purpose of this work. The objects of the research were rhizobium strains which formed nodules on roots of plant (the nodule-forming units — NFU), obtained in field experiment with application of preseeding processing of seeds of pea (*Pisum sativum* L.), fava beans (*Vicia faba* L.), lathyrus (*Lathyrus sativus* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.). The mixture of the collection strains allocated from nodules of peas and beans, and having various combinations of chromosomal and symbiotic genotypes was used for inoculation of seeds. Identification of NFU was carried out with the use of the analysis of the emitted nodule total DNA on several chromosomal markers: the *rpoB* gene and the *hin*-region, and the plasmid marker — *nodD* gene. It is established that only about 50% of nodules were formed by the strains used at inoculation of seeds. Besides, the combinations of chromosomal and symbiotic genotypes specific for a rhizobium — symbionts of concrete host plants have been established: IA genotype with *sym-2* for *P. sativum*; IB genotype with *sym-4* for *V. faba*. The re-

sults of this study create prerequisites for selection of couples: macro- and microsymbiont for the purpose of increasing efficiency of plant-microbial systems, in which the nature of symbiotic interaction defines efficiency of partners.

✿ **Keywords:** *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*; *Pisum*; *Vicia*; *Lathyrus*; *Lens*; *rpoB*; *hin*-region; *nodD*; specificity.

## ВВЕДЕНИЕ

Бобово-ризобиальный симбиоз является объектом многочисленных исследований мутуалистических взаимодействий, имеющих большое значение в сельскохозяйственной практике. Особый интерес в исследованиях симбиотических взаимодействий представляет высокая специфичность симбиоза, которая определяется механизмами узнавания партнеров — обменом молекулярными сигналами [1, 2]. Одними из наиболее специфичных считают взаимодействия между растениями трибы *Viciae* (*Vicia*, *Pisum*, *Lens* и *Lathyrus*) и бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* [3]. Хотя штаммы этого бивара способны к перекрестной инокуляции растений-хозяев (группы перекрестной инокуляции — ГПИ), эффективность фиксации атмосферного азота в образовавшихся клубеньках различается и, что важно, варьирует в зависимости от сорта растений [4–6]. Макросимбионт отбирает из общего почвенного микробиома конкретный генотип *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, предпочтительный для эффективного симбиоза. Например, культивируемые в Европе растения бобов (*Vicia faba* L.) строго избирательны к определенному *nod*-типу клубенек-образующих бактерий, тогда как культурный горох (*Pisum sativum* L.) и дикие бобовые (*Vicia* и *Lathyrus*) менее специфичны в выборе симбионтов [4, 5]. В литературе имеются данные о том, что штаммы, нодулирующие различные группы растений, например клевер и горох, могут относиться к одинаковым хромосомным генотипам и в то же время штаммы, образующие клубеньки на одном растении, могут относиться к филогенетически удаленным таксонам [7].

Образование эффективного симбиоза также определяется нодуляционной конкурентоспособностью конкретного генотипа ризобий — способностью формировать клубеньки в присутствии других вирулентных штаммов [8]. Однако мало что известно о механизмах, лежащих в основе конкурентоспособности штаммов

*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (*Rlv*) при инфицировании гороха посевного, и о специфичности складывающихся взаимодействий. В частности, пока нет ясности по поводу генетических маркеров сортовой (видовой) специфичности [9–11].

Цель работы состояла в оценке нодуляционной конкурентоспособности производственных штаммов на фоне аборигенных клубеньковых бактерий, а также анализе распределения генотипов штаммов, образовавших клубеньки на корнях четырех видов растений.

Схема эксперимента представляла собой полевой опыт, в рамках которого семена гороха, бобов, чины и чечевицы перед посадкой были инокулированы смесью производственных штаммов с различной комбинацией хромосомных и симбиотических генотипов. Генотипирование КлОЕ проводили путем выделения тотальной ДНК клубенька с последующим выявлением генетического полиморфизма на основании комплексного подхода — анализе последовательностей хромосомных маркеров ризобий (фрагмента гена  $\beta$ -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы (*rpoB*) и *hin*-региона [12]) и рестрикционном анализе плазмидного (симбиотического) маркера — фрагмента гена ризобиального симбиотического транскрипционного регулятора — *nodD*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клубеньковые бактерии-инокулянты были представлены активными штаммами из крымской коллекции микроорганизмов (ФГБУН «НИИ сельского хозяйства Крыма»), выделенными из клубеньков *Vicia faba* и *Pisum sativum* и имеющими различные сочетания хромосомных и симбиотических генотипов: *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Y-2, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Y-7, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 65 и *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* B-25 (табл. 1).

Таблица 1

Производственные штаммы клубеньковых бактерий, входящих в состав инокулята для предпосевной обработки семян

Table 1

Industrial nodule bacteria strains, which were a part of the inoculum for preseeding treatment

Штаммы	<i>hin</i> -генотип ( <i>hin</i> -регион)	<i>rpoB</i> -генотип ( <i>rpoB</i> ген)	<i>sym</i> -генотип ( <i>nodD</i> ген)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Y-2 ( <i>Pisum sativum</i> )	Ia	1	<i>sym</i> -4
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Y-7 ( <i>Pisum sativum</i> )	IB	2	<i>sym</i> -1
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 65 ( <i>Pisum sativum</i> )	IA	1	<i>sym</i> -1
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> B-25 ( <i>Vicia faba</i> )	IB	2	<i>sym</i> -4

Семена бобовых растений ГПИ — гороха (*Pisum sativum* L., сорт Девиз), чечевицы (*Lens culinaris* L., сорт Линза), чины (*Lathyrus sativus* L., сорт Сподиванка) и кормовых бобов (*Vicia faba* L., сорт Билун) были предоставлены ФГБУН «НИИ сельского хозяйства Крыма».

**Структура полевого опыта.** Семена перед посевом обрабатывали суспензией трехсуточных культур штаммов *Rlv* Y-2, Y-7, 65 и B-25, смешанных в равных пропорциях из расчета инокуляционной нагрузки —  $10^6$  бактерий/семя, в объеме — 2 % инокулята от массы семян. Полевой опыт с совместным посевом семян гороха, кормовых бобов, чины, чечевицы проводили в 2016 г. на площади опытного участка ( $10 \text{ м}^2$ ) на дерново-подзолистых почвах с пахотным горизонтом 20 см (Московская область, Россия). Ранее на данном участке бобовые культуры не выращивались, предшественником являлись томаты. Через 7 недель, когда все растения вошли в фазу цветения, с 10 растений каждого вида проводили сбор активных клубеньков. Для формирования усредненной выборки с каждого вида были отобраны по 24 клубенька и трехкратно отмыты от почвы в стерильной воде. Клубеньки не стерилизовали, так как оценку ДНК КлОЕ выполняли, минуя стадию выделения изолятов ризобий в чистую культуру. Далее из каждого клубенька была выделена тотальная ДНК.

Тотальную ДНК выделяли из клубеньков путем фенол-хлороформной экстракции с последующим осаждением изопропанолом [13]. Концентрацию выделенной ДНК определяли на флуориметре Qubit 2.0 с использованием набора реагентов Qubit Assays (Molecular probes, Life technologies, США).

ПЦР-амплификацию нуклеотидных последовательностей фрагмента гена бета-субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы *rpoB* проводили с использованием праймеров *rpoB\_F*: 5'-cctcatcgaggttcagaaggc-3' и *rpoB\_R*: 5'-agcgtgttcgggatagcg-3' [14]; *hin*-региона — с использованием специфических для рода *Rhizobium* праймеров *Pr. rhizF*: 5'-agaatgaaatctggtg-3' и *Pr. rhizR*: 5'-ggaagaggggttcgact-3' [15], гена ризобияльного симбиотического транскрипционного регулятора *nodD* — с использованием праймеров

NBA12: 5'-ggatgcaatcatctayrgmrtgg-3' и NBF12': 5'-ggatcraaagcatccrcastatgg-3' [16]. Для амплификации фрагмента гена *rpoB* применяли температурно-временной режим: первоначальная денатурация при  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  — 5 мин; последующие четыре цикла:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  — 2 мин,  $58 \text{ }^\circ\text{C}$  — 2 мин,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  — 1 мин; последующий 31 цикл:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  — 30 с,  $58 \text{ }^\circ\text{C}$  — 1 мин,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  — 1 мин; окончательная элонгация — 5 мин при  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ . Для амплификации фрагмента гена *nodD*: первоначальная денатурация при  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  — 3 мин; последующие 35 циклов:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  — 1 мин,  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  — 1 мин,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  — 2 мин; окончательная элонгация — 3 мин при  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ . Для амплификации *hin*-региона: первоначальная денатурация при  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  — 2 мин; последующие 35 циклов:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  — 1 мин,  $56 \text{ }^\circ\text{C}$  — 1 мин,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  — 1 мин; окончательная элонгация — 5 мин при  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ . Состав ПЦР-смеси соответствовал протоколу производителя (ЗАО «Евроген», Россия).

**Анализ длин рестрикционных фрагментов (RFLP).** Продукты амплификации фрагмента симбиотического гена *nodD* обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *MspI* согласно инструкциям производителя (Fermentas, США). Обработанную рестриктазами ДНК анализировали путем электрофоретического разделения в 3,0 % агарозном геле с визуализацией на трансиллюминаторе (ООО «Компания Биоком», Россия).

**Анализ нуклеотидных последовательностей.** Нуклеотидные последовательности фрагмента гена *rpoB* и *hin*-региона определяли методом прямого секвенирования [17] и сравнивали с последовательностями базы данных GenBank с помощью программы NCBI Blast [18]. В качестве референсных использовали нуклеотидные последовательности гена *rpoB* типовых штаммов ризобий, обладающих способностью образовывать клубеньки на растениях ГПИ: *R. leguminosarum* LMG 14904 T (AM295352.1), *R. pisi* DSM 30132 T (JN580751.1) и *R. fabae* CCBAU33202 T (FJ392877.1). Выравнивание последовательностей проводили с помощью программы BioEdit 7.0.5.2 [19]. Для построения филогенетических деревьев использовали программу Mega 5.1 [20] и алгоритм Neighbor-Joining (NJ) [21]. Последовательности фрагментов вышеупомянутых генов депонированы в NCBI GenBank (табл. 2).

Таблица 2

Номера последовательностей секвенированных маркеров клубенек-образующих единиц

Table 2

GenBank accession numbers for nucleotide sequences of the nodule-forming units

Изолят	Номер последовательности <i>hin</i> -региона в базе данных GenBank NCBI	Номер последовательности фрагмента гена <i>rpoB</i> в базе данных GenBank NCBI
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Lc1	MH814543	MH814557
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Lc10	MH814544	MH814558
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Lc11	MH814545	MH814559

Окончание табл. 2 (Table 2 continued)

Изолят	Номер последовательности <i>hin</i> -региона в базе данных GenBank NCBI	Номер последовательности фрагмента гена <i>rhoB</i> в базе данных GenBank NCBI
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Ls6	MH814546	MH814560
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Ls9	MH814547	MH814561
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Ls12	MH814548	MH814562
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Ls20	MH814549	MH814563
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Ps2	MH814550	MH814564
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Ps9	MH814551	MH814565
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Ps10	MH814552	MH814566
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Ps12	MH814553	MH814567
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Vi2	MH814554	MH814568
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Vi3	MH814555	MH814569
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Vi5	MH814556	MH814570

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках данного полевого испытания в качестве инокулятов были использованы производственные штаммы с четырьмя различными комбинациями генотипов. Исходно эти штаммы выделены из активных клубеньков гороха (*Pisum sativum* L.) и бобов (*Vicia faba* L.) и идентифицированы оригинаторами коллекции как *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (см. табл. 1).

В ранее проведенных лабораторных испытаниях при совместной инокуляции семян гороха и бобов смесью данных штаммов в преобладающем большинстве клубеньков были обнаружены штаммы со специфичной к растению-хозяину комбинацией маркеров, а именно: для гороха — IA/*sym*-1, для бобов — IB/*sym*-4 [22]. В рамках настоящего полевого испытания планировали оценить нодуляционную конкурентоспособность производственных штаммов на фоне аборигенных клубеньковых бактерий, а также проанализировать распределение генотипов КлОЕ у четырех видов растений.

### Анализ нуклеотидных последовательностей гена *rhoB*

Анализ тотальной ДНК клубеньков с амплификацией и секвенированием фрагмента маркерного гена *rhoB* показал наличие представителей *Rhizobium leguminosarum* во всех 96 клубеньках. Было выявлено 14 *rhoB*-генотипов КлОЕ, к двум из которых принадлежали штаммы-инокуляты: genotype 1 и genotype 2 (рис. 1).

Самая многочисленная группа genotype 1 (61 % КлОЕ) была представлена штаммами-инокулятами *Rlv* Y-2 и *Rlv* 65; также этот *rhoB*-генотип был характерен для типового штамма *R. leguminosarum* LMG 14904<sup>T</sup>. Ризобии с этим хромосомным генотипом образовывали клубеньки на корнях всех четырех видов растений ГПИ. Следующая по численности группа genotype 2 (15 % КлОЕ) была представлена штамма-

ми-инокулятами *Rlv* Y-7 и *Rlv* B-25. Данный генотип не выявлен в клубеньках гороха. Остальные 24 % КлОЕ были представлены *rhoB*-генотипами (native 3–14) аборигенных штаммов ризобий.

**Анализ симбиотического генотипа (*sym*-генотипа) КлОЕ.** Для определения *sym*-генотипа был использован метод рестрикционного анализа *nodD*-гена с применением *MspI*-рестриктазы. По результатам электрофоретического разделения продуктов рестрикции для всех четырех растений группы перекрестной инокуляции было выявлено четыре *sym*-генотипа и получено распределение их среди 96 КлОЕ (рис. 2, 3).

В клубеньках всех опытных растений доминировал четвертый *sym*-генотип ризобий (51 %), характерный для штаммов-инокулятов *Rlv* Y-2 и *Rlv* B-25. У менее четверти клубеньков был определен первый *sym*-генотип ризобий (13 %), характерный для штаммов-инокулятов *Rlv* 65 и *Rlv* Y-7. Остальные 36 % КлОЕ были представлены вторым и третьим *sym*-генотипами аборигенных штаммов ризобий. Кроме того, обнаружена явная специфичность ризобий с четвертым *sym*-генотипом — симбионтов *Vicia faba* L. (96 % КлОЕ) и ризобий со вторым *sym*-генотипом — симбионтов *Pisum sativum* L (54 %). У симбионтов чины и чечевицы также преобладал четвертый *sym*-генотип (см. рис. 3).

**Анализ хромосомного генотипа (*hin*-генотипа) КлОЕ.** Для достоверной оценки нодуляционной конкурентоспособности производственных штаммов на фоне аборигенных клубеньковых бактерий был проведен анализ внутривидового разнообразия КлОЕ при помощи метода *hin*-регион фингерпринтинга [12]. Ранее при работе с чистыми культурами коллекционных штаммов нами было установлено, что симбионты растений гороха и кормовых бобов относятся к двум генотипам: IA и IB, причем для изолятов ризобий бобов в подавляющем большинстве случаев характерен IB-генотип, а у изолятов гороха преобладает IA-генотип [15, 22].

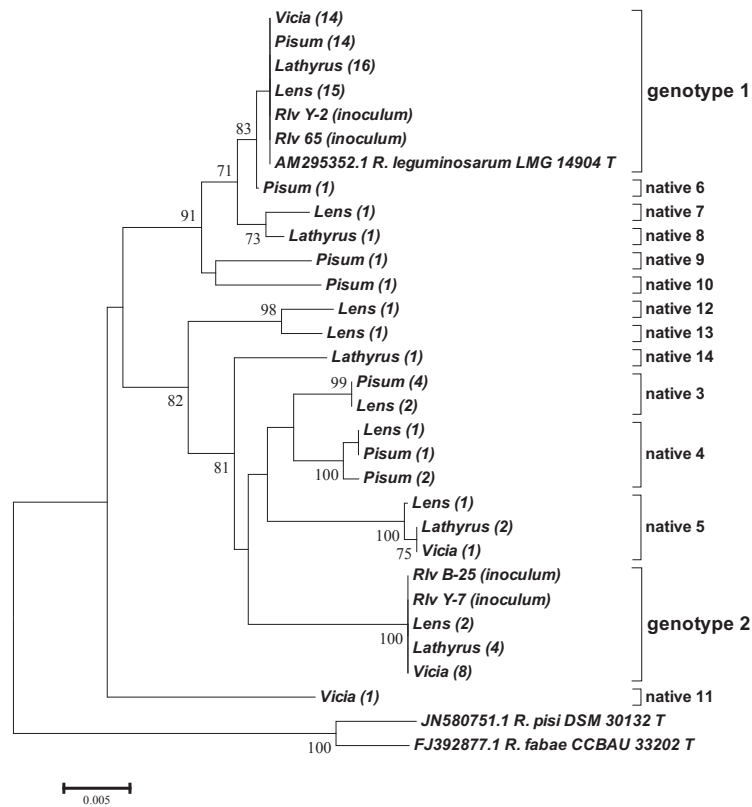


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе данных сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *rpoB* бактерий рода *Rhizobium* — симбионтов растений группы перекрестной инокуляции с использованием алгоритма NJ. В скобках указано число КЛОЕ данного генотипа, выявленных в клубеньках гороха (*Pisum*), чечевицы (*Lens*), чины (*Lathyrus*) и кормовых бобов (*Vicia*). Масштаб соответствует пяти заменам на 1000 пар оснований. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью bootstrap-анализа 1000 реплик. Значения bootstrap ниже 70 % не показаны

Fig. 1. The phylogenetic tree that was constructed on the basis of comparative sequence analysis of the fragment of *rpoB* gene of *Rhizobium* sp. — symbionts of cross-inoculation group plants using the NJ algorithm. Scale corresponds to 2 replacements by 100 couples of the bases. The numerals show the statistical reliability of the order of branching (%) defined by bootstrap analysis (1000 replicas). Bootstrap values less than 70% are not shown

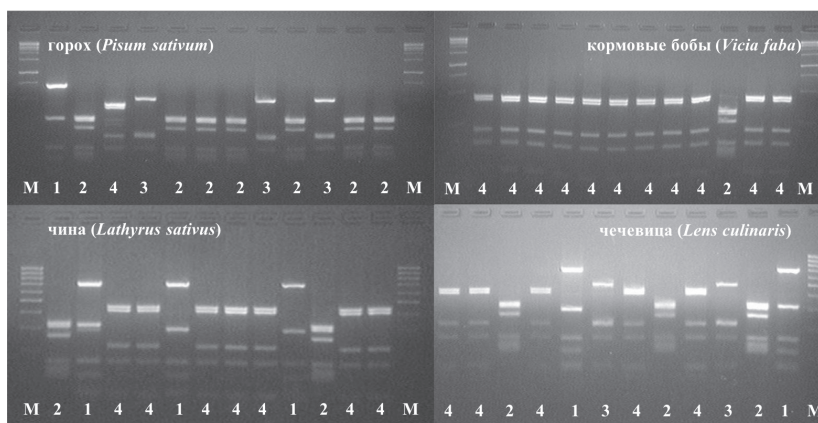


Рис. 2. RFLP-анализ фрагмента гена *nodD* с использованием рестриктазы *MspI*. Маркер длин ДНК 50+ bp DNA Ladder (ЗАО «Евроген»). Представлены результаты электрофоретического разделения продуктов реакции для 12 КЛОЕ каждого вида растения: чечевицы, чины, кормовых бобов и гороха. Цифрами (1–4) указаны соответствующие *sym*-генотипы

Fig. 2. The RFLP analysis of a fragment of *nodD* gene with use of a *MspI* restriction endonuclease. 50+ bp DNA Ladder. Electrophoretic profile for 12 nodule-forming units of each species of a plant are presented: lentil, lathyrus, fava beans and pea. *Sym*-genotypes are designated by figures (1–4)

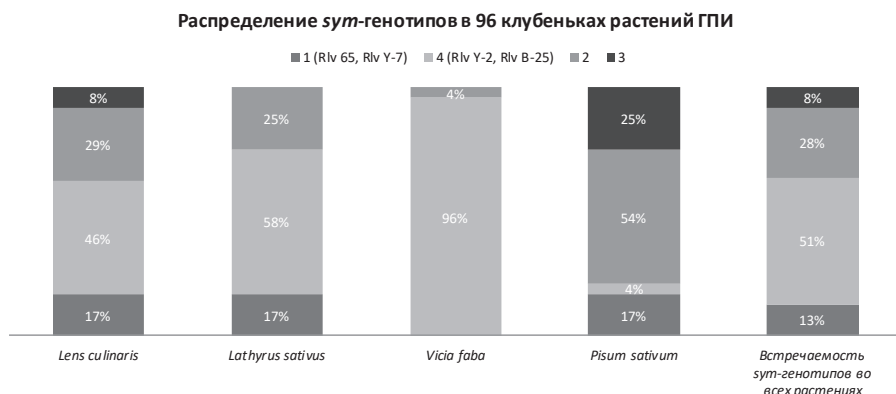


Рис. 3. Диаграмма распределения *sym*-генотипов КЛОЕ у растений группы перекрестной инокуляции: чечевицы, чины, бобов и гороха

Fig. 3. Diagram of distribution of *sym*-genotypes in the nodule-forming units of cross-inoculation group plants: lentil, lathyrus, fava beans and pea

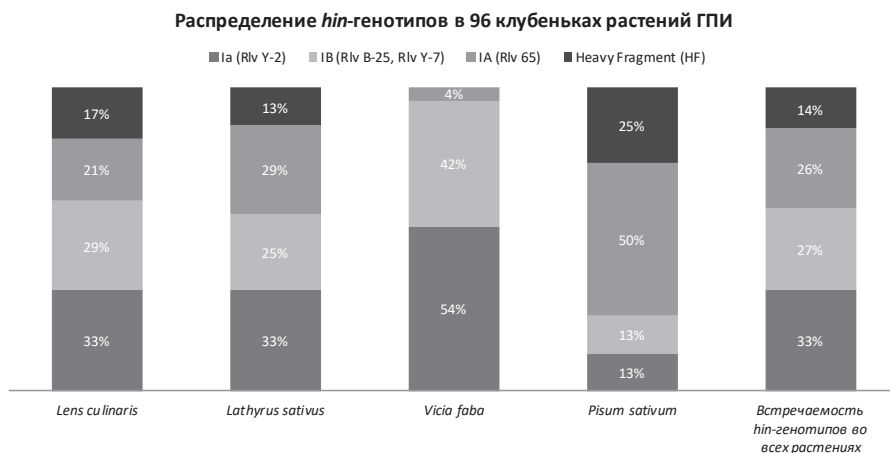


Рис. 4. Диаграмма распределения *hin*-генотипов КЛОЕ у растений группы перекрестной инокуляции: чечевицы, чины, бобов и гороха

Fig. 4. Diagram of distribution of *hin*-genotypes in the nodule-forming units of cross-inoculation group plants: lentil, lathyrus, fava beans and pea

При проведении скрининга КЛОЕ в данном исследовании было выявлено четыре генетических профиля: IA, IB, Ia и новый профиль — HF/Heavy Fragment/. Для симбионтов *V. faba* характерны Ia- и IB *hin*-генотипы, для *P. sativum* — IA-генотип ризобий (рис. 4). Интересно, что новый генотип HF удалось обнаружить только при использовании тотальной ДНК клубеньков, в то время как при работе с генетическим материалом чистых культур ризобий он не детектировался [14, 23].

**Анализ структуры *hin*-региона КЛОЕ растений ГПИ: гороха, кормовых бобов, чины и чечевицы.** Ранее нами была определена структура *hin*-региона (межгенный регион, расположенный между одноименными генами тРНК-Глу) коллекционных штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* — симбионтов гороха и бобов — это генотипы IA, Ia и IB [15]. По данным секвенирования этого межгенного региона генотип IA отличался от генотипа IB короткой встав-

кой (в 75 п. о.) в промоторной области второй копии гена тРНК-Глу (рис. 5). Генотип Ia, скорее всего, был образован путем делеции третьей копии гена тРНК-Глу в генотипе IA, либо посредством протяженной вставки между второй и третьей копиями гена тРНК. Впервые выявленный для симбионтов данных растений *hin*-генотип HF вероятно произошел от генотипа IA путем одной протяженной вставки (более 1000 п. о.) или мозаичной вставкой между первой и второй копиями гена тРНК-Глу. Поиск схожих нуклеотидных последовательностей в Генбанке в геномах ряда штаммов (*Rlv* BINB1217, CP022665.1; *Rlv* UPM791, CP025509.1) выявил вне их *hin*-регионов фрагмент данной вставки длиной 268 п. о. со сходством 87 % с фаговой ДНК в непосредственной близости с генами интегразы (locus\_tag="CHR56\_12185"), малой субъединицы терминазы (locus\_tag="CHR56\_12210") и серин-рекомбиназы (locus\_tag="CHR56\_12220").

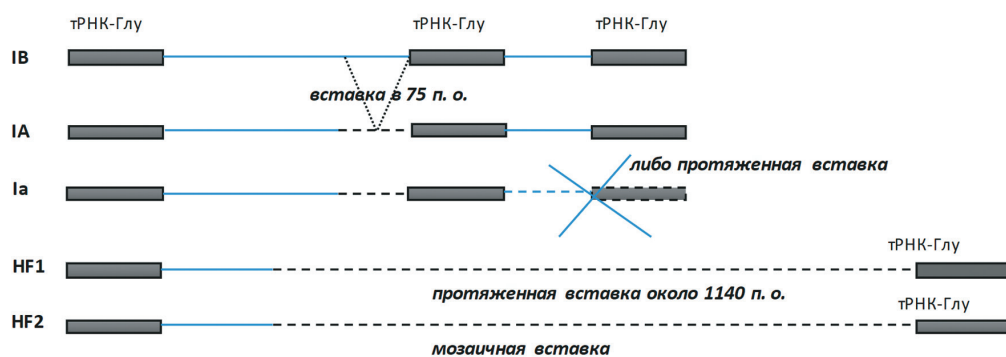


Рис. 5. Структура *hin*-региона *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*  
 Fig. 5. Structure of the *hin*-region of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

**Анализ специфичности симбиотических взаимодействий.** Сравнительный анализ данных по распределению симбиотических и хромосомных маркеров показал, что из всей выборки КЛОЕ было выявлено 17 генотипов с разной комбинацией маркеров. Генотипы КЛОЕ, схожие с генотипами инокулятов в клубеньках, были представлены в следующих пропорциях: *Rlv* Y-2 (32 %), *Rlv* B-25 (15 %), *Rlv* 65 (1 %), генотип, схожий с инокулятом *Rlv* Y-7, не был

обнаружен ни в одном клубеньке, несмотря на его исходную симбиотическую активность. Среди клубенько-образующих единиц гороха 50 % были представлены аборигенными генотипами с комбинацией маркеров — IA/1 (*rpoB*)/*sym*-2. Присутствие генотипов, схожих с генотипами инокулятов, в клубеньках по растениям следующее: *Pisum sativum* — 4 %, *Vicia faba* — 88 %, *Lens culinaris* — 42 %, *Lathyrus sativus* — 54 % (табл. 3).

Таблица 3

Распределение хромосомных и симбиотических (*sym*) генотипов в клубеньках растений группы перекрестной инокуляции

Table 3

The distribution of chromosomal and symbiotic (*sym*) genotypes in nodules of cross-inoculation group plants

Штамм/ КЛОЕ	Генотипы			Растения				Общая представленность генотипов в клубеньках (%)
	<i>hin</i>	<i>rpoB</i>	<i>sym</i>	<i>Ps</i>	<i>Vf</i>	<i>Lc</i>	<i>Ls</i>	
<i>Rlv</i> Y-2	Ia	1	4	1	13	8	8	32
<i>Rlv</i> 65	IA	1	1	—	—	—	1	1
native 1	IA	1	2	12	1	5	6	25
native 2	IB	1	1	—	—	1	—	1
native 3	HF	1	1	—	—	—	1	1
native 4	HF	1	2	1	—	1	—	2
<i>Rlv</i> Y-7	IB	2	1	—	—	—	—	0
<i>Rlv</i> B-25	IB	2	4	—	8	2	4	15
native 5	HF	3	3	4	—	2	—	6
native 6	IB	4	1	1	—	1	—	2
native 7	IB	4	3	2	—	—	—	2
native 8	IB	5	4	—	1	1	2	4
native 9	Ia	6	1	1	—	—	—	1
native 10	IB	7	1	—	—	1	—	1
native 11	HF	8	1	—	—	—	1	1
native 12	HF	9	1	1	—	—	—	1
native 13	Ia	10	1	1	—	—	—	1
native 14	IB	11	4	—	1	—	—	1

Окончание табл. 3 (Table 3 continued)

Штамм/ КлОЕ	Генотипы			Растения				Общая представленность генотипов в клубеньках (%)
	<i>hin</i>	<i>rpoB</i>	<i>sym</i>	<i>Ps</i>	<i>Vf</i>	<i>Lc</i>	<i>Ls</i>	
native 15	IB	12	1	—	—	1	—	1
native 16	HF	13	2	—	—	1	—	1
native 17	HF	14	1	—	—	—	1	1
Суммарное присутствие генотипов инокулятов в клубеньках				1/24 (4 %)	21/24 (88 %)	10/24 (42 %)	13/24 (54 %)	

Для растений *Vicia faba* L. оказалась характерной комбинация хромосомного маркера *hin*-регион Ia- и IB-генотипов с четвертым генотипом по симбиотическому маркеру — *nodD*-гену. Для растений *Pisum sativum* L. наблюдалась корреляция IA-генотипа со второй группой *sym*-генотипа. Выраженной специфичности в выборе микросимбионта у растений чины и чечевицы не выявлено. Структура *hin*-региона, а также комбинация этого маркера с *nodD*-геном дают основание предположить, что вышеупомянутый генотип HF, возможно, возникает в случае, когда штамм, образующий клубенёк у растений ГПИ, в своем составе несет «не подходящую» для данного растения (*sym*-1 и *sym*-3) плазмиду. Интересно, что второй по представленности *sym*-генотип КлОЕ (28 %) относился к местным почвенным популяциям ризобий, в то время как генотипами штаммов-инокулятов были *sym*-1 и *sym*-4.

В трудах других авторов приводятся как схожие, так и отличные от полученных в настоящей работе сведений о предпочтительности и комбинации хромосомных (как правило, RFLP-16S-23S гRNA) и симбиотических маркеров во взаимодействии с растениями ГПИ в Великобритании [4], Франции [24] и Испании [25]. Новизна данного исследования состоит в получении доказательств в пользу того, что нодуляционная конкурентоспособность разных штаммов ризобий в образовании клубеньков у гороха и бобов (применительно к конкретному географическому положению и агроклиматическим условиям) определяется не только хромосомной частью генома (*rpoB* и *hin*-регион), но и комбинацией с *sym*-2- и *sym*-4-генотипами.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы были выявлены комбинации хромосомных и симбиотических маркеров, специфичных для конкретного растения-хозяина. В анализ генетического разнообразия клубенёк-образующих единиц была добавлена оценка полиморфизма нового хромосомного маркера — *hin*-региона. По совокупности данных секвенирования тотальной ДНК каждого из клубеньков по двум маркерам (*rpoB*, *hin*-регион) во всех 96 исследуемых образцах однозначно определялся только один генотип КлОЕ, отличных генотипов

не было обнаружено. Однако это не исключало возможности наличия других штаммов бактерий в клубеньках.

Таким образом, было установлено, что только 48 % клубеньков были образованы штаммами, генотипы которых схожи с таковыми у штаммов-инокулятов, главным образом *Rlv* Y-2 (Ia-генотип и *sym*-4) — 32 % и *Rlv* B-25 (IB-генотип и *sym*-4) — 15 %. Также было показано, что генотип активного (Nod+) штамма-инокулята *Rlv* Y-7 (IA и *sym*-1) в данном опыте клубеньков не образовал ни на одном растении ГПИ, соответственно, не может рассматриваться в качестве перспективного для них производственного инокулята.

Также при анализе тотальной ДНК клубеньков с использованием *hin*-регион ПЦР для симбионтов растений ГПИ впервые был выявлен генотип HF (Heavy Fragment), присутствующий у аборигенных ризобий. В чистую культуру выделены два новых штамма с Ia- и HF-генотипами. В дальнейшем планируется сопоставить эффективность растительно-микробных взаимодействий штаммов всех четырех *hin*-генотипов на растениях гороха и бобов.

Принимая во внимание результаты проведенных работ представляется возможным создание микробных биопрепаратов на основе ризобий, регулирующих рост бобовых растений (Plant growth promoting rhizobia — PGPR), с учетом выявленной растительно-микробной специфичности. Использование потенциала подобных биопрепаратов будет способствовать развитию органического земледелия, экологически безопасного растениеводства и устойчивого сельского хозяйства [26, 27].

## БЛАГОДАРНОСТЬ

Статья подготовлена в рамках исследования с использованием средств субсидии Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 14.601.21.0016, уникальный идентификатор соглашения: RFMEFI60117X0016).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Lira MA, Jr., Nascimento LR, Fracetto GG. Legume-rhizobia signal exchange: promiscuity and environmental effects. *Front Microbiol.* 2015;6:945. doi: 10.3389/fmicb.2015.00945.



2. Oldroyd GE, Murray JD, Poole PS, Downie JA. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet.* 2011;45:119-144. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132549.
3. Проворов Н.А. Взаимосвязь между таксономией бобовых и специфичностью их взаимодействия с клубеньковыми бактериями // Ботанический журнал. — 1992. — Т. 77. — № 8. — С. 21–32. [Provorov NA. Vzaimosvyaz' mezhdru taksonomiej bobovykh i spetsifichnost'yu ikh vzaimodeistviya s kluben'kovymi bakteriyami. *Botanicheskii zhurnal.* 1992;77(8):21-32. (In Russ.)]
4. Mutch LA, Young JP. Diversity and specificity of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae on wild and cultivated legumes. *Mol Ecol.* 2004;13(8):2435-2444. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02259.x.
5. Laguerre G, Louvrier P, Allard MR, Amarger N. Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae for nodulation of host legumes. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(4):2276-2283. doi: 10.1128/AEM.69.4.2276-2283.2003.
6. Alvarez-Martinez ER, Valverde A, Ramirez-Bahena MH, et al. The analysis of core and symbiotic genes of rhizobia nodulating *Vicia* from different continents reveals their common phylogenetic origin and suggests the distribution of *Rhizobium leguminosarum* strains together with *Vicia* seeds. *Arch Microbiol.* 2009;191(8):659-668. doi: 10.1007/s00203-009-0495-6.
7. Mauchline TH, Hayat R, Roberts R, et al. Assessment of core and accessory genetic variation in *Rhizobium leguminosarum* symbiovar trifolii strains from diverse locations and host plants using PCR-based methods. *Lett Appl Microbiol.* 2014;59(2):238-246. doi: 10.1111/lam.12270.
8. Онищук О.П., Воробьев Н.И., Проворов Н.А. Нодуляционная конкурентоспособность клубеньковых бактерий: генетический контроль и адаптивное значение (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. — 2017. — Т. 53. — № 2. — С. 127–135. [Onishchuk OP, Vorobyov NI, Provorov NA. Nodulation Competitiveness of Nodular Bacteria: Genetic Control and Adaptive Significance. *Applied biochemistry and microbiology.* 2017;53(2):127-135. (In Russ.)] doi: 10.7868/S0555109917020131.
9. Yang C, Bueckert R, Schoenau J, et al. Symbiosis of selected *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae strains with diverse pea genotypes: effects on biological nitrogen fixation. *Can J Microbiol.* 2017;63(11):909-919. doi: 10.1139/cjm-2017-0281.
10. Bourion V, Heulin-Gotty K, Aubert V, et al. Co-inoculation of a Pea Core-Collection with Diverse Rhizobial Strains Shows Competitiveness for Nodulation and Efficiency of Nitrogen Fixation Are Distinct traits in the Interaction. *Front Plant Sci.* 2017;8:2249. doi: 10.3389/fpls.2017.02249.
11. Zou L, Chen YX, Penttinen P, et al. Genetic Diversity and Symbiotic Efficiency of Nodulating Rhizobia Isolated from Root Nodules of Faba Bean in One Field. *PLoS One.* 2016;11(12):e0167804. doi: 10.1371/journal.pone.0167804.
12. Патент РФ на изобретение № 2486251/ 25.08.11. Зотов В.С., Пунина Н.В., Топунов А.Ф. Способ идентификации и дифференциации прокариотических организмов. [Patent RUS No 2486251/ 25.08.11. Zotov VS, Punina NV, Topunov AF. Sposob identifikatsii i differentsiatsii prokarioticheskikh organizmov. (In Russ.)]
13. Laguerre G, Mazurier SI, Amarger N. Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae in field populations. *FEMS Microbiol Lett.* 1992;101(1):17-26. doi: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05757.x.
14. Martens M, Dawyndt P, Coopman R, et al. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008;58(Pt 1):200-214. doi: 10.1099/ijs.0.65392-0.
15. Зотов В.С., Пунина Н.В., Хапчаева С.А., и др. Новый таксономический маркер клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* и его эволюция // Экологическая генетика. — 2012. — Т. 10. — № 2. — С. 50–63. [Zotov VS, Punina NV, Khapchaeva SA, et al. A new taxonomic marker of nodule bacteria of the *Rhizobium* genus and its evolution. *Ecological genetics.* 2013;3(2):102-113. (In Russ.)]. doi: 10.17816/ecogen10250-63.
16. Laguerre G, Mavingui P, Allard MR, et al. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(6):2029-2036.
17. Sanger F, Air GM, Barrell BG, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature.* 1977;265(5596):687-695. doi: 10.1038/265687a0.
18. Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215(3):403-410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
19. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 1999;41(2):95-98.
20. Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28(10):2731-2739. doi: 10.1093/molbev/msr121.

21. Nei M, Kumar S. Molecular evolution and phylogenetics. New York: Oxford University Press; 2000.
22. Khapchaeva SA, Punina NV, Zotov VS, et al. Specific effectiveness of symbioses between *Pisum sativum* and *Vicia faba* and different genotypes of rhizobia. In: Proceedings of the 42<sup>nd</sup> Annual meeting ESNA 2013; Thessaloniki, 4-8 Sep 2013. Thessaloniki; 2013. p. 31.
23. Зотов В.С., Пунина Н.В., Хапчаева С.А., и др. Использование методов saAFLP и *hin*-регион ПЦР для генотипирования штаммов ризобий — симбионтов *Phaseolus vulgaris* // Таврический вестник аграрной науки. — 2013. — № 1. — С. 15–23. [Zotov VS, Punina NV, Khapchaeva SA, et al. Using of saafp and *hin*-region per for genotyping analysis of nodulating rhizobial symbionts of *Phaseolus Vulgaris*. *Tavrisheskiy vestnik agrarnoy nauki*. 2013;(1):15-23. (In Russ.)]
24. Depret G, Laguerre G. Plant phenology and genetic variability in root and nodule development strongly influence genetic structuring of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations nodulating pea. *New Phytol.* 2008;179(1):224-235. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02430.x.
25. Jorin B, Imperial J. Population Genomics Analysis of Legume Host Preference for Specific Rhizobial Genotypes in the *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Symbioses. *Mol Plant Microbe Interact.* 2015;28(3):310-8. doi: 10.1094/MPMI-09-14-0296-FI.
26. Пунина Н.В., Макридакис Н.М., Хапчаева С.А., и др. Применение молекулярных методов при создании растительных микробных препаратов // Таврический вестник аграрной науки. — 2016. — Т. 1. — № 5. — С. 20–34. [Punina NV, Makridakis NM, Khapchaeva SA, et al. Application of molecular methods for microbial inoculants for plants. *Tavrisheskiy vestnik agrarnoy nauki*. 2016;1(5):20-34. (In Russ.)]
27. Gopalakrishnan S, Sathya A, Vijayabharathi R, et al. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech.* 2015;5(4):355-377. doi: 10.1007/s13205-014-0241-x.

✿ Информация об авторах

**Софья Арсеновна Хапчаева** — младший научный сотрудник, группа альгобиотехнологии. Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва. SPIN: 2456-8389, E-mail: sakhapchaeva.1990@gmail.com.

**Светлана Витальевна Дидович** — кандидат с.-х. наук, старший научный сотрудник отдел сельскохозяйственной микробиологии. ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», Симферополь. SPIN: 4162-1908. E-mail: sv-alex.68@mail.ru.

**Алексей Федорович Топунов** — д-р биол. наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией биохимии азотфиксации и метаболизма азота. Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва. SPIN: 8379-6221. E-mail: aftopunov@yandex.ru.

**Андрей Львович Мулюкин** — д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник, руководитель ЦКП «Коллекция UNIQEM». Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва. SPIN: 1269-5440. E-mail: andlm@mail.ru.

**Василий Сергеевич Зотов** — канд. биол. наук, старший научный сотрудник, руководитель группы альгобиотехнологии. Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва. E-mail: adni83@yandex.ru.

✿ Information about the authors

**Sofya A. Khapchaeva** — Junior Researcher of Algal Biotechnology Group. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. SPIN: 2456-8389. E-mail: sakhapchaeva.1990@gmail.com.

**Svetlana V. Didovich** — Ph. D, Agriculture, Senior Research Scientist, Agricultural Microbiology Department. Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol, Russia. SPIN: 4162-1908. E-mail: sv-alex.68@mail.ru.

**Alexey F. Topunov** — Dr. Sci. (Biology), Chief Research Scientist, Head of the Laboratory of Biochemistry of Nitrogen Fixation and Nitrogen Metabolism. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. SPIN: 8379-6221. E-mail: aftopunov@yandex.ru.

**Andrey L. Mulyukin** — Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher, Head of the UNIQEM Collection Core Facility. S.N. Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. SPIN: 1269-5440. E-mail: andlm@mail.ru.

**Vasily S. Zotov** — Ph. D, Biology, Senior Research Scientist, Head of the Group of Algae Biotechnology. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. E-mail: adni83@yandex.ru.