

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ЭНДЕМИЧНЫХ ДЛЯ ЮЖНОГО УРАЛА ВИДОВ РОДА *OXYTROPIS* (FABACEAE)

© Ан.Х. Баймиев, А.А. Владимирова, Е.С. Акимова, Р.С. Гуменко, А.А. Мулдашев, А.В. Чемерис, Ал.Х. Баймиев
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Уфа

Для цитирования: Баймиев Ан.Х., Владимирова А.А., Акимова Е.С., и др. Филогенетическая характеристика клубеньковых бактерий эндемичных для Южного Урала видов рода *Oxytropis* (Fabaceae) // Экологическая генетика. – 2020. – Т. 18. – № 2. – С. 157–167. <https://doi.org/10.17816/ecogen17805>.

Поступила: 18.11.2019

Одобрена: 06.04.2020

Принята: 23.06.2020

✿ Проведен анализ полиморфизма и филогении клубеньковых бактерий эндемичных для Южного Урала четырех видов бобовых растений рода *Oxytropis* секции *Orobia*: *O. kungurensis*, *O. baschkiriensis*, *O. approximata*, *O. gmelinii*, характеризующихся пространственной разобщенностью мест произрастания, также называемой сегрегацией растений. Показано, что несмотря на определенные филогенетические различия бактерий, все они относятся к роду *Mesorhizobium*. Анализ симбиотических генов исследуемых штаммов на основании сравнительного анализа последовательностей генов *nifH* и *nodC* выявил определенные различия их филогении с коровой частью генома. Обнаружено, что микросимбионты растений *O. baschkiriensis* по филогении гена *nodC* отличаются от ризобий, полученных из клубеньков других изученных видов рода *Oxytropis* и близки к микросимбионтам растений рода *Lupinaster*, произрастающих на Южном Урале. Приобретение свойства вступать в симбиоз с клубеньковыми бактериями, характерными для растений рода *Lupinaster*, могло быть следствием сегрегации *O. baschkiriensis* от других родственных видов рода *Oxytropis*.

✿ **Ключевые слова:** ризобия; симбиоз; *Oxytropis*; филогения; симбиотические гены.

PHYLOGENETIC CHARACTERISTIC OF NODUL BACTERIA ENDEMIC FOR SOUTHERN URAL SPECIES OF THE GENUS *OXYTROPIS* (FABACEAE)

© An.Kh. Baymiev, A.A. Vladimirova, E.S. Akimova, R.S. Gumenko, A.A. Muldashev, A.V. Chemeris, Al.Kh. Baymiev

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

Cite this article as: Baymiev AnKh, Vladimirova AA, Akimova ES, et al. Phylogenetic characteristic of nodul bacteria endemic for Southern Ural species of the genus *Oxytropis* (Fabaceae). *Ecological genetics*. 2020;18(2):157-167. <https://doi.org/10.17816/ecogen17805>.

Received: 18.11.2019

Revised: 06.04.2020

Accepted: 23.06.2020

✿ **Background.** An analysis of the spatial distribution of some taxonomically and ecologically related legumes in the Ural showed a nontrivial spatial distribution of related species of the genus *Oxytropis* DC of the *Orobia* Bunge section within the Uchalinsky uplands. Despite the similarities in ecology, these species practically do not grow together. Explicit spatial segregation of closely related plants over a relatively small area allows this phenomenon to be used as a convenient model for studying the effect of segregation of closely related legume species on the genetic composition of their nodule bacteria. **Materials and methods.** The genetic diversity of nodule bacteria entering into symbiosis with *O. kungurensis*, *O. baschkiriensis*, *O. approximata* and *O. gmelinii* plants was studied. In addition, the polymorphism of their symbiotic genes has also been analyzed. **Results.** Phylogenetic characteristics of nodule bacteria endemic for the Southern Ural belonging to 4 species of leguminous plants of the genus *Oxytropis* of the section *Orobia*: *O. kungurensis*, *O. baschkiriensis*, *O. approximata*, *O. gmelinii* which are characterized by spatial separation of the growth sites, also called plant segregation, are given. It was shown that all of them belong to the genus *Mesorhizobium* despite certain phylogenetic differences of bacteria. Analysis of the symbiotic genes of the analyzed strains revealed a lack of congruence of their phylogeny with the core part of the genome. It was found that the microsymbionts of *O. baschkiriensis* plants differ in the phylogeny of nod-genes from nodule bacteria of other plants of the *Oxytropis* genus and are close to microsymbionts of plants of the *Lupinaster* genus growing in the Southern Urals. **Conclusion.** Acquisition of the property to enter into symbiosis with nodule bacteria of plants of the genus *Lupinaster* may turn out to be an adaptive mechanism that arose as a result of segregation of *O. baschkiriensis* from other species of *Oxytropis*.

✿ **Keywords:** rhizobia; symbiosis; *Oxytropis*; phylogeny; symbiotic genes.

ВВЕДЕНИЕ

Клубеньковые бактерии (ризобии) — обширная, генетически разнородная группа почвенных граммотрицательных микроорганизмов, способных вступать во внутриклеточный симбиоз с бобовыми растениями и обеспечивать фиксацию атмосферного азота.

В ходе продолжительной совместной эволюции бобовых растений и ризобий возникла сигнальная система взаимодействия между симбионтами, обеспечивающая специфическое узнавание партнеров и ведущая к их генетической интеграции [1]. Для бобовых умеренных широт, где обитают наиболее специализированные и эволюционно молодые представители подсемейства мотыльковых, характерно высокоспецифичное взаимодействие по типу «групп перекрестной инокуляции», при котором ризобии определенного вида или даже биотипа вступают в эффективный симбиоз с представителями лишь определенного рода или нескольких близких родов растений [2]. Такое повышение специфичности взаимодействия партнеров эволюционно сопровождалось с одной стороны увеличением азотфиксирующей активности [3], с другой — увеличением зависимости бобовых растений от своих микросимбионтов. Поэтому на ареал распространения дикорастущих бобовых умеренной зоны в связи с их тесной взаимосвязью с клубеньковыми бактериями и относительно высокой специфичностью их взаимодействия наряду с эдафическими и климатическими факторами не исключено и влияние микробиома почвы [4, 5].

Анализируя особенности пространственного распределения некоторых таксономически и экологически близких видов бобовых растений на Урале, М.С. Князевым [5] был отмечен ряд нетривиальных случаев, объяснение которых может пролить свет на пространственное распределение этих растений. Наиболее четко своеобразие отмечаемого феномена проявляется на примере пространственного распределения близких видов рода *Oxytropis* DC секции *Orobia* Bunge в пределах Учалинского мелкосопочника, который представляет серию невысоких предгорных пологих хребтов, подножье которых покрыто редколесьями, а вершины заняты участками горных степей. Таким образом, произрастающие здесь степные виды, приуроченные большей частью к вершинам

холмов, представлены серией обособленных популяций. Учалинский мелкосопочник — флористически оригинальная территория; ряд видов уральской флоры произрастает только или преимущественно в пределах этого района, в том числе есть узкие эндемики Учалинского мелкосопочника. Только здесь отмечается перекрывание ареалов сразу пяти видов (в том числе одного гибридогенного) рода *Oxytropis* секции *Orobia*: *O. kungurensis* Knjasev subsp. *demidovii* (Knjasev) Knjasev (далее *O. kungurensis*), *O. baschkiriensis* Knjasev subsp. *skvortsovi* Knjasev (далее *O. baschkiriensis*), *O. approximata* Less., *O. gmelinii* Fisch. ex Boriss., *O. spicata* (Pall.) O. et B. Fedtach., *O. × lessingiana* Knjasev. Данные таксоны являются экологическими двойниками, растут в сходных сообществах. Несмотря на сходство экологии, эти виды практически не произрастают совместно. Данное явление было обозначено под термином сегрегации растений. В качестве весьма характерного примера сегрегации следует привести распределение местонахождений двух видов *O. baschkiriensis* и *O. gmelinii* на участке мелкосопочника, обрамляющем правобережье р. Урал на протяжении 20 км долины севернее устья р. Миндяк. Непосредственно близ устья р. Миндяк на небольших холмах отмечается произрастание только *O. Gmelinii*; 2 км севернее, на сопке Туйтюбе (575 м), в тех же условиях — только *O. baschkiriensis*, на соседней сопке с Туйтюбе — только *O. approximata*; еще 2–4 км севернее на ряде вершин хр. Улутау произрастает *O. gmelinii* [5].

Явная пространственная сегрегация близкородственных растений на относительно небольшой территории делает возможным использовать это явление в качестве удобной модели для исследования влияния пространственной разобщенности близкородственных видов бобовых на генетический состав их клубеньковых бактерий.

Цель работы — проверка генетических различий ризобий, полученных из клубеньков близкородственных видов остролодочников, подверженных сегрегации.

В связи с этим нами было исследовано генетическое разнообразие и филогения клубеньковых бактерий, вступающих в симбиоз с растениями *O. kungurensis*, *O. baschkiriensis*, *O. approximata*, *O. gmelinii* и проведен анализ филогении их сим-

биотических генов *nifH* (кодирует структуру белков нитрогеназы) и *nodC* (кодирует структуру кодовой части молекулы Nod-фактора, участвующего в сигналинге при образовании клубеньков).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы и условия культивирования

В работе были использованы изоляты клубеньковых бактерий, выделенные из клубеньков растений *O. kungurensis*, *O. baschkiriensis* s. l., *O. approximata*, *O. gmelinii*, произрастающих на Южном Урале в районе Учалинского мелкосопочника.

Бактерии из клубеньков изолировали методом получения пункций из зоны размножения бактерий и рассеивали ее на питательной агаризованной среде УМ (0,1 % дрожжевой экстракт, 1 % маннит, 0,05 % K_2HPO_4 , 0,05 % $MgSO_4$, 0,01 % NaCl, 1,5 % агар) до отдельных колоний [6]. Из каждого клубенька получали по одной чистой культуре бактерий. Предварительную проверку изолятов на принадлежность их к группе клубеньковых бактерий проверяли методом ПЦР-анализа наличия гена *nifH*, характерного для всех видов ризобий.

Выделение тотальной ДНК

ДНК из бактерий выделяли методом термокоагуляции. Для этого в пробирки объемом 1,5 мл со 100 мкл 1 % Triton X100 и 1 % суспензии смолы Chelex100 (Bio-Rad, США) помещали небольшое количество бактериальной массы и после суспензирования инкубировали при температуре 95 °C 10 мин. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 12000 g в течение 3 мин. Надосадочную жидкость брали в качестве матрицы для ПЦР.

Генетический анализ штаммов

Генетическое разнообразие собранных штаммов исследовали с помощью RAPD-анализа (Random Amplified Polymorphic DNA) [7] с использованием следующих «случайных» праймеров: 1) 5'-ggggcgtg-3'; 2) 5'-caggeccatc-3'; 3) 5'-gcgtccattc-3'. Данный анализ также позволил сократить количество образцов, за счет объединения микроорганизмов с идентичными RAPD-профилями в гомогенные группы, из которых в последующем в работу брали только по одному образцу.

ПЦР-ПДРФ-анализ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) [8] гена *16S* рРНК проводили с использованием мелкощепящих эндонуклеаз рестрикции *Kzo91* и *HaeIII*. Для амплификации гена *16S* рРНК были использованы универсальные праймеры fD1 5'-cccgggatccaagcttaaggaggtgatccagcc-3', rD1 5'-ccgaattcgtcgacaacagagtttgatcctggctcag-3', фланкирующие фрагмент гена размером около 1500 п. н. [9], для амплификации генов *recA* были использованы праймеры RecAF 5'-ggcagttcggaagggtcgcgat-3' и RecAR5'-atctggttgatgaagatcacat-3', для амплификации генов *nifH* — NifHF 5'-ttctatggaaagggcgccattggcaagct-3' и NifHR5'-atctcgcggacatgacgatataaatttc-3', для амплификации генов *nodC* — NodCF 5'-cgtttcgttctatgcgggtgctc-3' и NodCR5'-cagctgcgtctcgtattgat-3' [10].

Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3500 фирмы Applied Biosystems, Inc. (США) с использованием наборов Big Dye Terminator v.3.1.

Филогенетический анализ

Филогенетический анализ исследуемых штаммов осуществляли на основании множественного выравнивания (ClustalW) секвенированных фрагментов генов *16S* рРНК, *recA*, *nodC* и *nifH*. Построение филогенетических деревьев производили с помощью программы Megalign из пакета программ Lasergene с использованием метода «neighbor-joining» (NEIGHBOR). Нуклеотидные последовательности для сравнительного анализа были взяты из базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Статистическую достоверность ветвления («bootstrap-анализ») оценивали с использованием соответствующей функции программы Megalign на основе 1000 альтернативных деревьев.

Нуклеотидные последовательности генов *16S* рРНК, *recA*, *nodC* и *nifH* исследованных штаммов депонированы в базе GenBank под следующими номерами: МК402237-МК402258, МК511967-МК511971, МК511979, МК511980.

Опыты по перекрестной инокуляции

Анализ клубенкообразующей способности штаммов на корнях исследуемых видов растений проводили методом предпосевной инокуляции семян.

Обработанные суспензией бактерий ($3-7 \times 10^6$ КОЕ/мл) семена высаживали в отдельные горшочки со стерильным песком. Через 30–40 дней корни растений анализировали визуально на наличие образовавшихся клубеньков. Опыты проводили в 5-кратной повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования генетического разнообразия микросимбионтов с корнями исследуемых растений, произрастающих на территории Южного Урала, были собраны клубеньки, из которых были изолированы чистые культуры ризобий. Так, из клубеньков 19 растений *O. approximata* были получены 32 чистые культуры бактерий, из клубеньков 28 растений *O. baschkiriensis* 56 культур, из клубеньков 8 растений *O. kungurensis* — 16, и из клубеньков 4 растений *O. gmelinii* — 6. Такое соотношение количества чистых культур и растений вызвано тем, что на корнях каждого растения обнаруживалось не более 2–3 клубеньков. В дальнейшем с каждого клубенька получали по одной чистой культуре бактерий. Исследование генетического разнообразия полученных изолятов методом RAPD-анализа выявил определенный полиморфизм ДНК исследуемых образцов, которые формировали 27 генетически однородных групп. Так, изоляты, полученные из клубеньков *O. Approximata*, относились к 7 генетически однородным группам, изоляты, полученные из клубеньков *O. baschkiriensis* s. l., — к 13, *O. kungurensis* s. l. — к 6, *O. Gmelinii* — к одной группе (рис. 1).

Предварительный филогенетический анализ, проведенный посредством 16S-ПДРФ, выявил, что штаммы образуют, в свою очередь, 8 монофилетических групп. Соответственно, штаммы ризобий из клубеньков *O. kungurensis* образовали 2 группы,

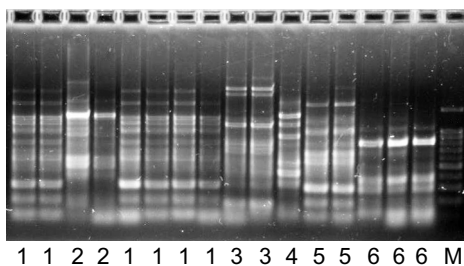


Рис. 1. Фореграмма RAPD-анализа ДНК ризобий, изолированных из клубеньков *O. kungurensis*. Цифрами обозначены номера генетически однородных групп. М — маркер 100 п. н.

O. baschkiriensis s. l. — 3, *O. approximata* — 2, и *O. gmelinii* — 1 монофилетическую группу.

С целью определения филогенетической принадлежности представителей выявленных групп микроорганизмов было проведено секвенирование консервативных генов (*16S* рРНК и *recA*) и их сравнительный анализ с другими аналогичными генами, депонированными в GenBank. Результаты показали, что исследуемые штаммы ризобий хотя и имеют некоторые филогенетические отличия, но тем не менее все относятся к роду *Mesorhizobium*. По гену *16S* рРНК сходство штаммов составило от 98,4 до 99,8 %, а по гену *recA* — от 89,7 до 96,7 %. Степень филогенетического родства штаммов не зависела от того, являются ли они симбионтами одного вида растения или разных, поскольку у растений одного вида в клубеньках обнаруживались бактерии, имеющие большие филогенетические различия, чем у бактерий, выделенных из клубеньков разных видов *Oxytropis* (рис. 2, 3). Таким образом, пространственное разделение и отсутствие совместного произрастания исследуемых растений нельзя объяснить влиянием видового состава и филогенетических различий их ризобий.

За взаимодействие с макросимбионтом у клубеньковых бактерий отвечают продукты специализированных *sym*-генов. Они включают в себя ответственные за фиксацию азота *nif*-гены, кодирующие синтез и регуляцию фермента нитрогеназы; *nod*-гены, кодирующие синтез Nod-факторов (НФ), отвечающих за инициацию и специфичность образуемого симбиоза; а также *fix*-гены, которые также необходимы для азотфиксации, часто сцепленные с *nif*-генами, но не гомологичные с ними [11, 12].

На сегодняшний день проведено большое количество исследований, свидетельствующих о высокой мобильности *sym*-генов и подверженности их горизонтальному переносу (ГПГ) [13–18]. Доказано, что данный процесс является неотъемлемой частью эволюции бобово-ризобиальных взаимоотношений [19–22] и зачастую приводит к появлению штаммов с измененной хозяйской специфичностью или к приобщению новых видов микроорганизмов к группе клубеньковых бактерий [23]. Участие ГПГ в эволюции ризобий подтверждается локализацией *sym*-генов на мобильных генетических элементах (плазмиды или хромосомные островки,

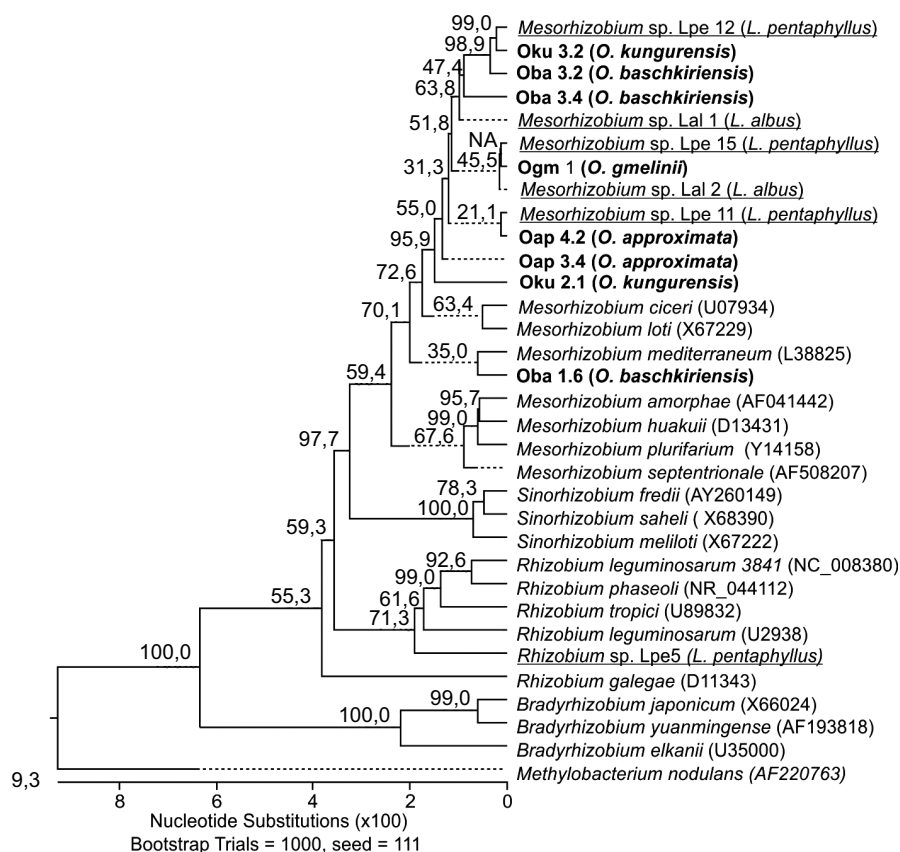


Рис. 2. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена 16S рРНК. Жирным шрифтом отмечены штаммы микроорганизмов, исследованных в данной работе, подчеркиванием обозначены штаммы, выделенные из клубеньков *L. pentaphyllum* и *L. albus*

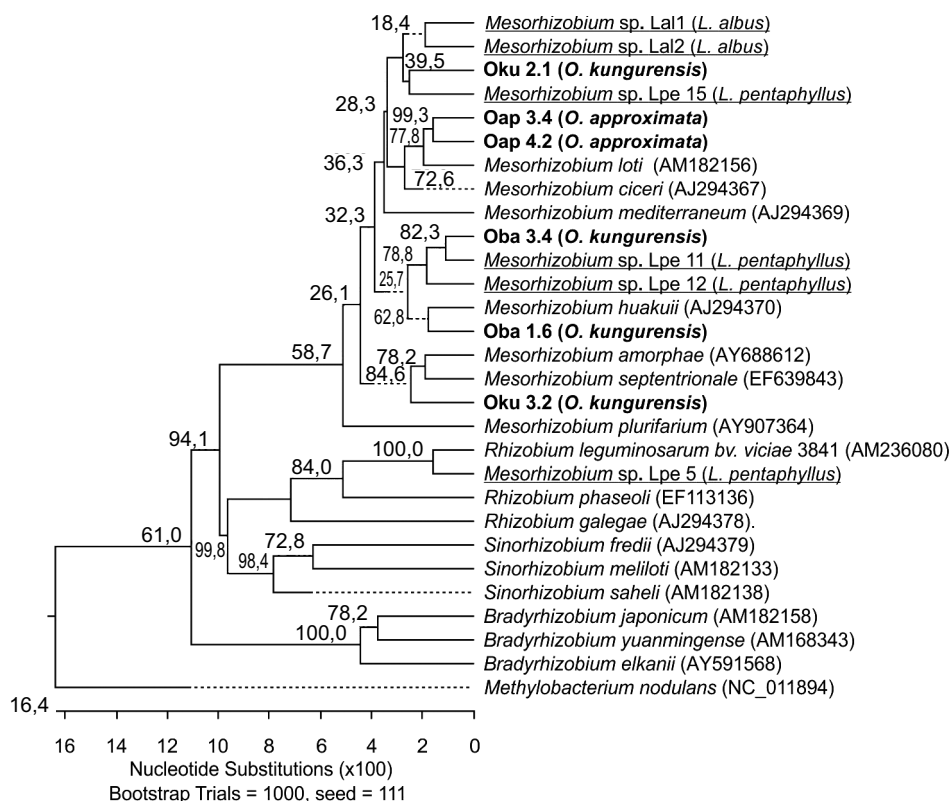


Рис. 3. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена *recA*. Жирным шрифтом отмечены штаммы микроорганизмов, исследованных в данной работе, подчеркиванием обозначены штаммы, выделенные из клубеньков *L. pentaphyllum* и *L. albus*

ограниченные IS-подобными элементами), а также характерной для них панмиктической структурой популяций [24]. Широкая экспансия *sym*-генов в ассоциированных с растениями бактериальных сообществах посредством ГПГ, как считается, является наиболее вероятным способом формирования современного разнообразия ризобий и проявляется в различиях филогении симбиотических генов и генов «домашнего хозяйства» [14, 25]. Поэтому анализ симбиотических генов является неотъемлемой частью работы по исследованию разнообразия клубеньковых бактерий.

В данной работе исследование филогении симбиотических генов штаммов проводили на основании сравнительного анализа последовательностей генов *nodC* и *nifH* с аналогичными последовательностями других клубеньковых бактерий, взятых из базы данных GenBank (рис. 4, 5).

Исследование филогении гена *nifH* всех анализируемых бактерий показало их близость с аналогичными генами, преимущественно обнаруживаемыми у бактерий рода *Mesorhizobium*. При этом различия в нуклеотидных последовательностях *nifH* всех анализируемых бактерий были весьма незначительные. Наибольшая разница обнаружена между последовательностями гена *nifH* двух штаммов Оку 3.2 и Оку 2.1, вступающих в симбиоз с растениями *O. kungurensis*. Тем не менее схожесть между ними составила 92 %, что говорит о консервативности генов нитрогеназы данных бактерий.

Исследование же последовательностей *nod*-генов выявило некоторые интересные закономерности. ПЦР-ПДРФ-анализ гена *nodC* представителей всех гомогенных групп исследуемых микроорганизмов показал разделение бактерий на две группы по схожести полос на фореграмме. Первую группу составляли микроорганизмы, выделенные из клубеньков *O. baschkiriensis*, вторую — микроорганизмы, выделенные из клубеньков других исследованных растений (данные не представлены). При анализе филогении гена *nodC* на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей было обнаружено, что клубеньковые бактерии растений *O. baschkiriensis* по гену *nodC* значительно отличаются от ризобий других представителей рода *Oxytropis*, произрастающих на Южном Урале (74,5–78 % схожести). Одновременно с этим они имеют 99 % и более схожести

с микросимбионтами растений рода *Lupinaster* Fabr. (*L. pentaphyllus* и *L. albus*), исследованных нами ранее [26], которые произрастают совместно с видами *Oxytropis* (см. рис. 4). Надо отметить, что в настоящее время систематическое положение растений рода *Lupinaster* спорно и общая точка зрения в этом вопросе пока не сформирована. Ранее нами было обнаружено, что данные растения вступают в симбиоз с бактериями рода *Mesorhizobium*, что не характерно для растений трибы *Trifolieae*, к которым их причисляют [26]. Но, несмотря на спорную ситуацию с систематическим положением рода *Lupinaster*, очевидно, что данные растения не родственны с растениями рода *Oxytropis*. Наличие в составе генома клубеньковых бактерий *O. baschkiriensis* гена *nodC*, почти идентичного аналогичным генам ризобий растений *Lupinaster*, свидетельствует о неких приспособительных эволюционных процессах. Остается пока неясным, явилось ли предпочтение *O. baschkiriensis* вступать в симбиоз с клубеньковыми бактериями с генами *nodC*, не характерными для других видов остролодочников, произрастающих на Южном Урале, причиной сегрегации или же следствием пространственного разделения данного вида от других видов остролодочника. По крайней мере выявлена определенная закономерность различия в составе клубеньковых бактерий сегрегирующих видов растений, что может послужить ключом к разгадке эндемичности некоторых видов бобовых растений. Следует также подчеркнуть, что для *O. baschkiriensis* на Учалинском мелкосопочнике не выявлено ни одного случая отступления от правила сегрегации, в то время как для некоторых других остролодочников единичные случаи встречаются (например, совместное произрастание *O. kungurensis* s. l. и *O. approximata*). *O. baschkiriensis* был выделен относительно недавно [27] из широко распространенного вида *O. ambigua* (Pall.) DC. s. l. (Восточная Европа — до Вологодской обл. на западе, Западная и Восточная Сибирь, Монголия) [28] и отличается от него принципиальными признаками. Возможно, столь обширный ареал *O. ambigua* s. l. (включая *O. baschkiriensis* s. str.), нехарактерный для видов секции *Orobia*, связан с генетической схожестью ризобий *Lupinaster pentaphyllus* s. l., характеризующийся также широким распространением

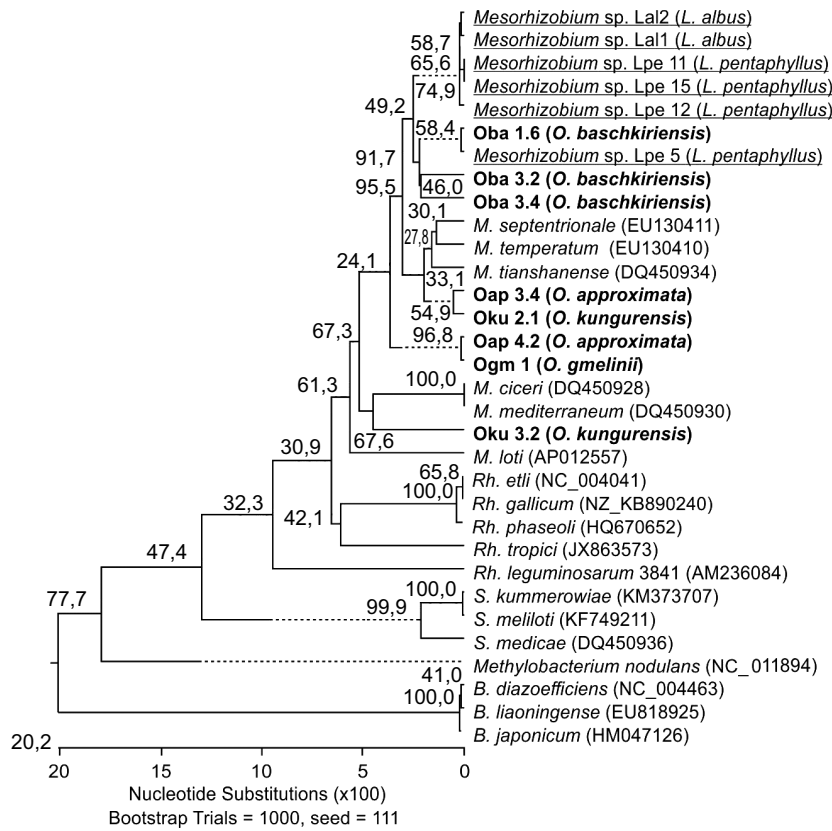


Рис. 4. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена *nifH*. Жирным шрифтом отмечены штаммы микроорганизмов, исследованных в данной работе, подчеркиванием обозначены штаммы, выделенные из клубеньков *L. pentaphyllus* и *L. albus*

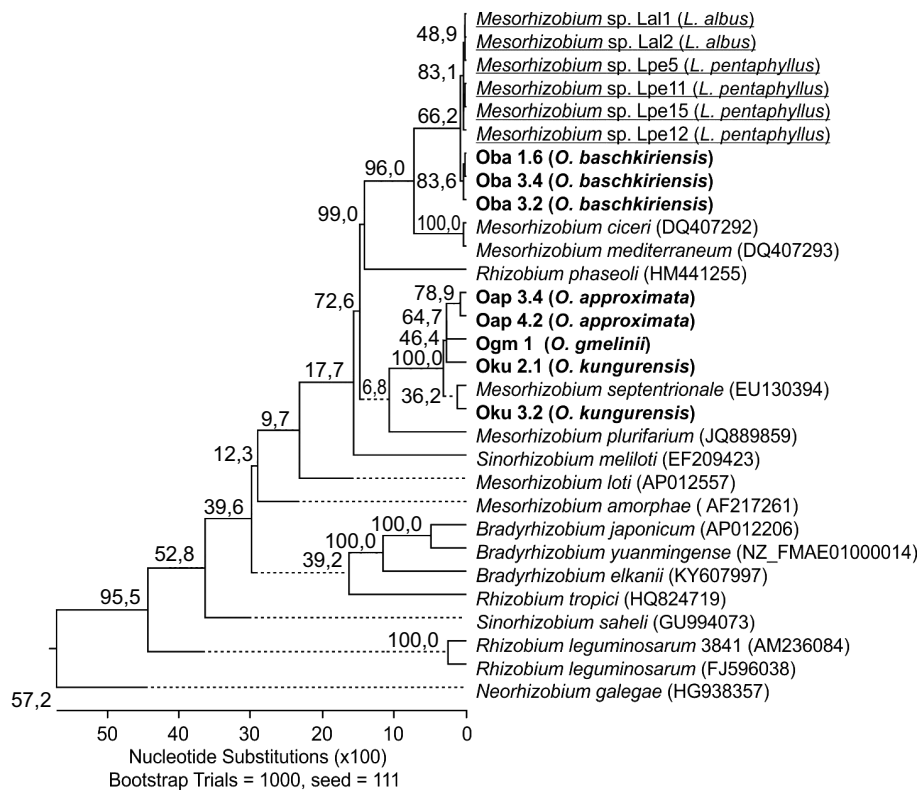


Рис. 5. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена *nodC*. Жирным шрифтом отмечены штаммы микроорганизмов, исследованных в данной работе, подчеркиванием обозначены штаммы, выделенные из клубеньков *L. pentaphyllus* и *L. albus*

(от Восточной Европы до Монголии и Дальнего Востока).

Кроме того, сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей выявил значительные отличия симбиотических *nod*-генов клубеньковых бактерий растений *O. baschkiriensis* и растений рода *Lupinaster* от всех известных *nod*-генов, описанных ранее у бактерий рода *Mesorhizobium*, что выводит их в отдельную кладу на филогенетическом древе (рис. 4). При этом, сами симбионты растений *O. baschkiriensis*, *L. pentaphyllus* и *L. albus* имеют между собой 99 % и более сходства по этому гену, независимо от филогении самих бактерий. Это говорит о том, что у данных растений должна быть высокая и уникальная специфичность со своими микросимбионтами, и, скорее всего, данные растения не входят в одну группу перекрестной инокуляции с другими растениями, вступающими в симбиоз с бактериями рода *Mesorhizobium*.

Наши исследования подтвердили это предположение. опыты по перекрестной инокуляции *O. baschkiriensis* и *O. approximata* клубеньковыми бактериями, выделенными из клубеньков этих растений, показали, что многочисленные розовые (активные) клубеньки формируются только в случае взаимодействия растений со штаммами, выделенными из клубеньков того же вида; при инокуляции же растений ризобиями другого вида в обоих случаях клубеньки не образуются или формируются малочисленные мелкие белого цвета, что говорит о слабой функциональности этих клубеньков. В то же время, перекрестная инокуляция растений *O. baschkiriensis*, *L. pentaphyllus* и *L. albus* их микросимбионтами приводит к образованию активных клубеньков во всех комбинациях, что говорит о принадлежности вышеперечисленных видов к одной группе перекрестной инокуляции.

Различия в филогении *nod*- и *nif*-генов анализируемых штаммов, вероятно, объясняются тем, что полиморфизм *nod*-генов больше коррелирует с таксономией растений-хозяев, нежели с коровыми элементами своего генома. А гены, ответственные за азотфиксацию, в свою очередь, в связи с консервативностью функции кодируемых ими белков, менее вариабельны, и их полиморфизм часто имеет бóльшую корреляцию с дивергенцией коровой части генома бактерий. В то же время эти две группы генов способны придавать бактериям

свойства симбиотической азотфиксации только совместно, в геноме они формируют у бактерий рода *Mesorhizobium* островки симбиоза и поэтому при ГПГ передаются тоже вместе. Это, в свою очередь, также сказывается на их эволюции, и приводит к неполному совпадению филогении *nif*-генов и коровой части генома [30, 31].

Таким образом, нами было обнаружено, что сегрегации близкородственных бобовых растений может приводить в некоторых случаях к изменению генетического состава их клубеньковых бактерий, что приводит к невозможности их перекрестной инокуляции. Для растений *O. baschkiriensis* приобретение свойства вступать в симбиоз с аборигенными штаммами клубеньковых бактерий *Mesorhizobium*, содержащих уникальные *nod*-гены, обнаруживаемые, на сегодняшний день, только у клубеньковых бактерий бобовых Южного Урала, могло стать приспособительным механизмом, который мог поспособствовать к закреплению *O. baschkiriensis* в новых ареалах.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-44-020201.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тихонович И.А., Борисов А.Ю., Цыганов В.Е., и др. Интеграция генетических систем растений и микроорганизмов при симбиозе // Успехи современной биологии. — 2005. — Т. 125. — № 3. — С. 227–238. [Tihonovich IA, Borisov AYU, Cyganov VE, et al. Integration of plant and microbial genetic systems in symbiosis. *Advances in modern biology*. 2005;125(3):227-238. (In Russ.)]
2. Проворов Н.А. Специфичность взаимодействия клубеньковых бактерий с бобовыми растениями и эволюция бобово-ризобияльного симбиоза // Сельскохозяйственная биология. — 1985. — Т. 20. — № 3. — С. 34–47. [Provorov NA. Specificnost' vzaimodejstviya kluben'kovyh bakterij s bobovymi rasteniyami i evolyuciya bobovorizobial'nogo simbioza. *Sel'skokhoziaistvennaia biologija*. 1985;20(3):34-47. (In Russ.)]
3. Парийская А.Н., Клевенская И.Л. Распространение в природе и возможные пути эволюции азотфиксирующего симбиоза // Успехи микробиологии. — 1979. — Т. 14. — С. 124–147. [Parijskaya AN, Klevenskaya IL. Rasprostranenie

- v prirode i vozmozhnye puti evolyucii azotfik-siruyushchego simbioza. *Uspekhi mikrobiologii*. 1979;14:124-147. (In Russ.)]
4. La Pierre KJ, Simms EL, Tariq M, et al. Invasive legumes can associate with many mutualists of native legumes, but usually do not. *Ecol Evol*. 2017;7(20):8599-8611. <https://doi.org/10.1002/ece3.3310>.
 5. Simonsen AK, Dinnage R, Barrett LG, et al. Symbiosis limits establishment of legumes outside their native range at a global scale. *Nat Commun*. 2017;8:14790. <https://doi.org/10.1038/ncomms14790>.
 6. Князев М.С. Бобовые (Fabaceae LINDL.) Урала: видообразование, географическое распространение, историко-экологические свиты: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — СПб., 2015. — 40 с. [Knyazev MS. Bobovyye (Fabaceae LINDL.) Urala: vidoobrazovaniye, geograficheskoye rasprostraneniye, istoriko-ekologicheskkiye svity. [dissertation abstract] Saint Petersburg; 2015. 40 p. (In Russ.)]. Доступно по: <https://search.rsl.ru/ru/record/01005560640>. Ссылка активна на 02.02.2020.
 7. Баймиев А.Х., Птицын К.Г., Баймиев А.Х. Влияние интродукции караганы древовидной на состав ее клубеньковых бактерий // Микробиология. — 2010. — Т. 79. — № 1. — С. 123–128. [Baymiev AnK, Ptitsyn KG, Baimiev AIK. Influence of the introduction of Caragana arborescens on the composition of its root nodule bacteria. *Microbiology*. 2010;79(1):123-128. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S0026261710010157>.
 8. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(22):6531-6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>.
 9. 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. <https://doi.org/10.1128/aem.62.6.2029-2036.1996>.
 10. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. 1991;173(2):697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.
 11. Баймиев А.Х., Иванова Е.С., Гуменко Р.С., и др. Анализ симбиотических генов клубеньковых бактерий бобовых растений Южного Урала // Генетика. — 2015. — Т. 51. — № 12. — С. 1359–1367. [Baymiev AK, Ivanova ES, Gumenko RS, et al. Analysis of symbiotic genes of leguminous root nodule bacteria grown in the Southern Urals. *Genetika*. 2015;51(12):1359-1367. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S001667581511003X>.
 12. Проворов Н.А. Эволюция генетических систем симбиоза у клубеньковых бактерий // Генетика. — 1996. — Т. 32. — № 8. — С. 1029–1040. [Provorov NA. Evolution of symbiotic genetic systems in rhizobia. *Genetika*. 1996;32(8):1029-1040. (In Russ.)]
 13. Franche C, Lindström K, Elmerich C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*. 2009;321(1-2):35-59. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8>.
 14. Fischer HM. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev*. 1994;58(3):352-386. <https://doi.org/10.1128/membr.58.3.352-386.1994>.
 15. Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Эволюционная генетика клубеньковых бактерий: молекулярные и популяционные аспекты // Генетика. — 2000. — Т. 36. — № 12. — С. 1573–1587. [Provorov NA, Vorob'ev NI. Evolutionary genetics of nodule bacteria: Molecular and population aspects. *Genetika*. 2000;36(12):1573-1587. (In Russ.)]
 16. Nandasena KG, O'hara GW, Tiwari RP, Howieson JG. Rapid in situ evolution of nodulating strains for *Biserrula pelecinus* L. through lateral transfer of a symbiosis island from the original mesorhizobial inoculant. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(11):7365-7367. <https://doi.org/10.1128/AEM.00889-06>.
 17. Andam CP, Mondo SJ, Parker MA. Monophyly of *nodA* and *nifH* genes across Texan and Costa Rican populations of *Cupriavidus* nodule symbionts. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(14):4686-4690. <https://doi.org/10.1128/AEM.00160-07>.

18. Barcellos FG, Menna P, da Silva Batista JS, Hungria M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah soil. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(8):2635-2643. <https://doi.org/10.1128/AEM.01823-06>.
19. Zhao CT, Wang ET, Chen WF, Chen WX. Diverse genomic species and evidences of symbiotic gene lateral transfer detected among the rhizobia associated with *Astragalus* species grown in the temperate regions of China. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;286(2):263-273. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01282.x>.
20. Bailly X, Olivieri I, Brunel B, et al. Horizontal gene transfer and homologous recombination drive the evolution of the nitrogen-fixing symbionts of *Medicago* species. *J Bacteriol.* 2007;189(14):5223-5236. <https://doi.org/10.1128/JB.00105-07>.
21. Freiberg C, Fellay R, Bairoch A, et al. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature.* 1997;387(6631):394-401. <https://doi.org/10.1038/387394a0>.
22. Estrella MJ, Muñoz S, Soto MJ, et al. Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(4):1088-1098. <https://doi.org/10.1128/AEM.02405-08>.
23. Marchetti M, Capela D, Glew M, et al. Experimental evolution of a plant pathogen into a legume symbiont. *PLoS Biol.* 2010;8(1):e1000280. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000280>.
24. Zaneveld JR, Nemergut DR, Knight R. Are all horizontal gene transfers created equal? Prospects for mechanism-based studies of HGT patterns. *Microbiology.* 2008;154(Pt 1):1-15. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011833-0>.
25. Provorov NA, Vorobyov NI. Simulation of legume-rhizobia symbiosis evolution under the multi-strain competition of bacteria for inoculation of symbiotic habitats. *Ecol Gen.* 2008;6(4):3-11. <https://doi.org/10.17816/ecogen643-11>.
26. Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Роль горизонтального переноса генов в эволюции клубеньковых бактерий, направляемой растением-хозяином // Успехи современной биологии. — 2010. — Т. 130. — № 4. — С. 336–345. [Provorov NA, Vorob'ev NI. Impact of horizontal gene transfer on evolution of root nodule bacteria directed by host plant. *Advances in modern biology.* 2010;130(4):336-345. (In Russ.)]
27. Баймиев А.Х., Акимова Е.С., Гуменко Р.С., и др. Генетическое разнообразие и филогения клубеньковых бактерий, выделенных из клубеньков растений рода *Lupinaster*, произрастающих на Южном Урале // Генетика. — 2019. — Т. 55. — № 1. — С. 52–59. [Baymiev AK, Akimova ES, Gumenko RS, et al. Genetic diversity and phylogeny of root nodule bacteria isolated from nodules of plants of the *Lupinaster* genus inhabiting the Southern Urals. *Genetika.* 2019;55(1): 52-59. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S0016675819010028>.
28. Князев М.С. Заметки по систематике и хорологии видов рода *Oxytropis* (Fabaceae) на Урале. II. Виды родства *Oxytropis ambigua* // Ботанический журнал. — 2001. — Т. 86. — № 1. — С. 126–134. [Knyazev MS. Zametki po sistematike i horologii vidov roda *Oxytropis* (Fabaceae) na Urale. II. Vidy rodstva *Oxytropis ambigua*. *Botanicheskiy zhurnal.* 2001;86(1): 126-134. (In Russ.)]
29. Акулова З.В., Бобров Е.Г., Васильева Л.И., и др. Флора европейской части СССР. Т. VI / отв. ред. А.А. Федоров. — Л.: Наука, 1987. — 254 с. [Akulova ZV, Bobrov EG, Vasil'eva LI, et al. Flora evropeyskoy chasti SSSR. Vol. VI. Ed by A.A. Fedorov. Leningrad: Nauka; 1987. 254 p. (In Russ.)]
30. Карасев Е.С., Чижевская Е.П., Симаров Б.В., и др. Сравнительный анализ филогений симбиотических генов клубеньковых бактерий с использованием метадеревьев // Сельскохозяйственная биология. — 2017. — Т. 52. — № 5. — С. 995–1003. [Karasev ES, Chizhevskaya EP, Simarov BV, et al. Comparative phylogenetic analysis of symbiotic genes of different nodule bacteria groups using the meta-trees method. *Sel'skokhoziaistvennaia biologiya.* 2017;52(5):995-1003. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.5.995rus>.

31. Карасев Е.С., Андронов Е.Е., Аксенова Т.С., и др. Эволюции ризобий козлятника (*Neorhizobium galegae*): анализ полиморфизма генов фиксации азота и развития клубеньков // Генетика. — 2019. — Т. 55. — № 2. — С. 234–238. [Karasev ES, Andronov EE, Aksenova TS, et al.

Evolution of Goat's Rue Rhizobia (*Neorhizobium galegae*): analysis of polymorphism of the nitrogen fixation and nodule formation genes. *Genetika*. 2019;55(2): 234-238. (In Russ.)). <https://doi.org/10.1134/S0016675819020085>.

✿ Информация об авторах

Андрей Ханифович Баймиев — д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов, Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение. ФГБНУ УФИЦ РАН, Уфа. SPIN: 1919-5236. E-mail: baymiev@anrb.ru.

Анастасия Андреевна Владимирова — аспирант лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов. Институт биохимии и генетики. ФГБНУ УФИЦ РАН, Уфа. E-mail: vladimirovaw@bk.ru.

Екатерина Сергеевна Акимова — канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов. Институт биохимии и генетики. ФГБНУ УФИЦ РАН, Уфа. SPIN: 6595-2452. E-mail: iv.katerina-bio@yandex.ru.

Роман Сергеевич Гуменко — младший научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов. Институт биохимии и генетики. ФГБНУ УФИЦ РАН, Уфа. SPIN: 4216-4301. E-mail: r.gumenko@yandex.ru.

Альберт Акрамович Мулдашев — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории геоботаники и охраны растительности. Уфимский институт биологии. ФГБНУ УФИЦ РАН, Уфа. SPIN: 1362-7915. E-mail: muldashev_ural@mail.ru.

Алексей Викторович Чермерис — д-р биол. наук, главный научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов. Институт биохимии и генетики. ФГБНУ УФИЦ РАН, Уфа. SPIN: 1248-2582. E-mail: chemeris@anrb.ru.

Алексей Ханифович Баймиев — д-р биол. наук, заведующий лабораторией биоинженерии растений и микроорганизмов. Институт биохимии и генетики. ФГБНУ УФИЦ РАН, Уфа. SPIN: 3771-4063. E-mail: baymiev@mail.ru.

✿ Authors and affiliations

Andrei Kh. Baymiev — PhD, Leading Researcher, Laboratory of Plant and Microbial Bioengineering. Institute of Biochemistry and Genetics. Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. SPIN: 1919-5236. E-mail: baymiev@anrb.ru.

Anastasiya A. Vladimirova — Graduate Student, Laboratory of Plant and Microbial Bioengineering. Institute of Biochemistry and Genetics. Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. E-mail: vladimirovaw@bk.ru.

Ekaterina S. Akimova — PhD, Researcher, Laboratory of Plant and Microbial Bioengineering. Institute of Biochemistry and Genetics. Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. SPIN: 6595-2452. E-mail: iv.katerina-bio@yandex.ru.

Roman S. Gumenko — Junior Researcher, Laboratory of Plant and Microbial Bioengineering. Institute of Biochemistry and Genetics. Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. SPIN: 4216-4301. E-mail: r.gumenko@yandex.ru.

Albert A. Muldashev — PhD, Senior Researcher, Ufa Institute of Biology. Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. SPIN: 1362-7915. E-mail: muldashev_ural@mail.ru.

Alexei V. Chemeris — PhD, Laboratory of Plant and Microbial Bioengineering. Institute of Biochemistry and Genetics. Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. SPIN: 1248-2582. E-mail: chemeris@anrb.ru.

Alexei Kh. Baymiev — PhD, Head of Laboratory of Plant and Microbial Bioengineering. Institute of Biochemistry and Genetics. Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. SPIN: 3771-4063. E-mail: baymiev@mail.ru.