

© Д. В. Крутило¹, В. С. Зотов²

¹ Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН, Чернигов, Украина;

² ФГБУН Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, Москва, Россия

✳ **Проведён анализ последовательностей гена 16S рРНК и межгенного региона 16S-23S рРНК (ITS) клубеньковых бактерий сои, отличающихся скоростью роста и выделенных из почв Украины с различной интенсивностью выращивания данной культуры. В результате показана близость штаммов с интенсивным ростом к ризобиям сои группы USDA 123. Исследуемые штаммы, как и другие представители этой группы, обладают повышенной сапрофитной компетентностью. Рестрикционный анализ последовательностей межгенного региона ITS ризобий сои позволил разделить их на два ITS-типа: первый ITS-тип — штаммы с интенсивным ростом и второй ITS-тип — медленнорастущие штаммы. Такое разделение штаммов соответствует распределению их на физиологические группы.**

✳ **Ключевые слова:** *Bradyrhizobium japonicum*; 16S рРНК; 16S-23S рРНК (ITS); RFLP-анализ; секвенирование ДНК; *Glycine max*.

ГЕНОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ, НОДУЛИРУЮЩИХ СОЮ В ПОЧВАХ УКРАИНЫ

Известно, что в процессе фиксации молекулярного азота из атмосферы важная роль принадлежит клубеньковым бактериям, которые способны инициировать образование азотфиксирующих клубеньков на корнях бобовых растений. Благодаря этой способности ризобии рассматривают как ценный генетический ресурс для создания микробных препаратов.

В последнее время большое внимание уделяется изучению естественных природных популяций клубеньковых бактерий — микросимбионтов как традиционных, так и редких бобовых культур. Исследование генетического разнообразия специфических клубеньковых бактерий является одной из актуальных задач почвенной микробиологии (Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями, 2002).

Учитывая важность такой ценной зернобобовой культуры, как соя, наше внимание было направлено на изучение популяций ее микросимбионтов (клубеньковых бактерий) в почвах разных регионов Украины.

Известно, что соя может вступать в симбиоз с клубеньковыми бактериями нескольких видов: медленнорастущими *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii*, *B. liaoningense* (Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями, 2002; Willems, 2006) и быстрорастущими *Sinorhizobium fredii*, *S. xinjiangensis* (Chen et al., 1988) и *Mesorhizobium thianshanense* (Chen et al., 1995).

Следует отметить, что в почвах Украины нет аборигенных клубеньковых бактерий сои, поскольку дикая соя и другие бобовые из группы перекрестно заражаемых растений (вигна, маш) в естественных фитоценозах не встречаются (Толкачев, 1997). Формирование же почвенных популяций специфических для сои ризобий началось сравнительно недавно, с момента интенсивного внедрения этой культуры в севообороты. Согласно литературным данным, типичными микросимбионтами культурной сои в почвах Украины выступают медленнорастущие бактерии вида *B. japonicum*, которые были интродуцированы в агроценозы в составе коммерческих биопрепаратов (Ризоторфин российского и украинского производства) (Бабич, 1993; Патица та ін., 2003; Толкачев, 1990). Поэтому популяции ризобий сои являются чрезвычайно удобным объектом для изучения процессов микроэволюции, в результате которых может происходить дивергенция микросимбионтов сои, связанная с их адаптацией, как к различным генотипам растений, так и к новым почвенно-климатическим условиям.

В течение нескольких лет (2001–2004 гг.) нами изучалось распространение клубеньковых бактерий сои в агроценозах с различной интенсивностью выращивания данной культуры (соя в севообороте 10–30 лет). Полученные результаты свидетельствуют о том, что в почвах страны сформировались и функционируют разные по численности локальные популяции клубеньковых бактерий сои. Несмотря на однообразие интродуцированных штаммов-инокулянтов, почвенные популяции оказались достаточно гетерогенными. В результате анализа морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств 180 штаммов ризобий сои, выделенных из почв различных регионов Украины, нами впервые обнаружены клубеньковые бактерии (Крутило та ін., 2008), существенно отличающиеся от медленнорастущих симбионтов сои вида *B. japonicum*, описанных ранее (Jordan, 1982). Известно, что среди бактерий рода *Bradyrhizobium* выделяют несколько групп штаммов, от-

Поступила в редакцию 05.04.2013
Принята к публикации 01.10.2013

личающихся по скорости роста (Jordan, 1982; Keyser, Sreagan, 1987; Xu et al., 1995). Выделенные нами штаммы характеризовались повышенной скоростью роста и были условно названы «штаммами с интенсивным ростом». Серологический анализ 45 штаммов клубеньковых бактерий сои показал, что 20 штаммов с интенсивным ростом, независимо от их географического происхождения, относились к одной серогруппе. Медленнорастущие клубеньковые бактерии оказались серологически гетерогенными и были отнесены, как минимум, к 5 серогруппам. Еще одной важной отличительной особенностью ризобий сои с интенсивным ростом является их чувствительность к антибиотикам (штаммы чувствительны к 7–9 из 17 исследованных антибиотических веществ), что не характерно для медленнорастущих клубеньковых бактерий.

Следует отметить, что штаммы с интенсивным ростом встречаются не во всех регионах Украины. Соотношение между представителями этих двух групп изменяется в зависимости от почвенно-климатической зоны, а количество выделенных штаммов с интенсивным ростом колеблется в пределах от 33 % до 53 % (Патика та ін., 2010).

В связи с тем, что в Украине генетическое разнообразие клубеньковых бактерий сои в популяциях не анализировалось, целью нашей работы было изучить генотипические свойства микросимбионтов сои как медленнорастущих, так и штаммов с интенсивным ростом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований были 6 выделенных нами штаммов — типичных представителей клубеньковых бактерий сои с медленным и интенсивным ростом из Коллекции полезных почвенных микроорганизмов Института сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН. В качестве референтного использован типовой штамм *B. japonicum* USDA 6^T = ATCC 10324^T. Ризобии сои выделяли из корневых клубеньков сои сорта Устя, которую выращивали на образцах почвы, отобранных в различных регионах Украины (2001–2006 гг.): Черниговской (Носовская селекционно-опытная станция, чернозем выщелоченный), Винницкой (Институт кормов и сельского хозяйства Подолья НААН, серая лесная почва) и Сумской (Институт сельского хозяйства Северного Востока НААН, чернозем типичный) областях.

Выделение ДНК. Для выделения препаратов суммарной клеточной ДНК штаммы клубеньковых бактерий сои культивировали на агаризованной среде TY (Beringer, 1974). Тотальная ДНК штаммов ризобий была выделена из свежих культур (экспоненциальная фаза роста) путём лизиса бактериальных клеток лизоцим-SDS с последующей фенол-хлороформной экстракцией и осаждением изопропанолом (Laguegrie et al., 1992).

RFLP анализ и секвенирование гена 16S рРНК. Амплификацию нуклеотидной последовательности

гена 16S рРНК для рестрикционного анализа осуществляли с вырожденными бактериальными праймерами fBD1/rBD1: 642i (5'-HAATHYGTGCCAGCAGC-3'), 1445r (5'-GTCRTCCYDCCTCCTC-3') (Коростик и др., 2006). Реакцию проводили на автоматическом амплификаторе HYBAID Omn-E в следующем режиме: начальная денатурация при 94 °C — 3 мин, 35 циклов, 94 °C — 30 с, 55 °C — 30 с, 72 °C — 1 мин, окончательная элонгация при 72 °C — 7 мин. Обработанную рестриктазой *MspI* («Fermentas», США) ДНК анализировали при помощи электрофореза в 4%-м агарозном геле.

Матрицы для секвенирования генов 16S рРНК синтезировали с помощью ПЦР, используя универсальные для большинства эубактерий праймеры fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и rP2 (5'-ACGGCTACCTGTACGACTT-3') (Weisburg et al., 1991). ПЦР проводили на амплификаторе GeneAmp PCR System 2720 в следующем режиме: начальная денатурация при 94 °C — 5 мин, 30 циклов, 94 °C — 30 с, 55 °C — 30 с, 72 °C — 30 с, окончательная элонгация при 72 °C — 7 мин. Амплифицированные фрагменты детектировались при помощи электрофореза в 1,5% агарозном геле. Секвенирование осуществляли на автоматическом ДНК-секвенаторе ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США).

RFLP анализ и секвенирование межгенного спейсера 16S-23S рДНК (ITS). Амплификацию межгенного региона рибосомального кластера (ITS) для последующего рестрикционного анализа проводили с использованием праймеров FGPS1490–72: (5'-TGCGGCTGGATCCCCTCCTT-3') (Normand et al., 1996) и FGPL132–38 (5'-CCGGGTTTCCCCATT-3') (Ponsonnet, Nesme, 1994). Температурно-временной профиль амплификации: денатурация при 94 °C — 30 с, отжиг праймеров при 55 °C — 30 с, синтез комплементарной цепи при 72 °C — 1 мин (30 циклов). Рестрикционный анализ проводился с использованием эндонуклеазы рестрикции *MspI* согласно инструкциям производителя. Обработанную рестриктазой ДНК анализировали при помощи электрофореза в 4%-м агарозном геле.

Секвенирование нуклеотидных последовательностей ITS проводили на секвенаторе Genetic Analyzer 3130xl («Applied Biosystems», США).

Анализ нуклеотидных последовательностей. Сравнительный анализ полученных последовательностей с последовательностями базы данных GenBank проводили с помощью программы NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul et al., 1990). Выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы CLUSTALW 1.75v. (Thompson et al., 1994), их проверку и редактирование проводили в редакторе «BioEdit 7.0.5.3» (Hall, 1999). Филогенетические деревья строили в программе Mega 3.1 (Kumar et al., 2004) с помощью алгоритма Neighbor-Joining NJ (Nei, Kumar, 2000).

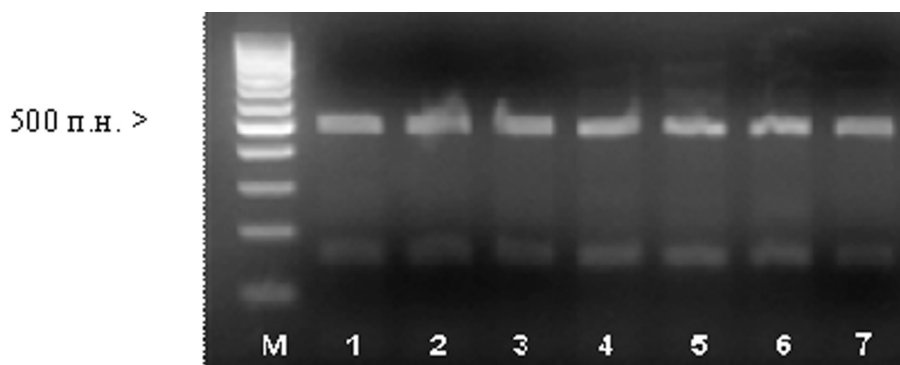


Рис. 1. Электрофоретический анализ продуктов рестрикции фрагмента гена 16S рРНК штаммов ризобий сои после обработки его рестриктазой *MspI*: М — маркер молекулярного веса; 1, 2, 3 — штаммы ризобий сои с интенсивным ростом (KB11, KC19, KC22); 4 — типовой штамм *B. japonicum* USDA 6^T; 5, 6, 7 — медленно растущие штаммы ризобий сои (46, KC23, KH10)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что для молекулярной дифференциации штаммов микроорганизмов широко используется метод риботипирования, который базируется на объединении их в группы по признаку сходства последовательностей гена 16S рРНК. Для первичной молекулярной дифференциации штаммов клубеньковых бактерий сои с разной скоростью роста, выделенных из почв различных регионов Украины, использовали два варианта метода риботипирования: 1) ПЦП-RFLP — анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов 16S рРНК, 2) секвенирование гена 16S рРНК.

В результате ПЦП с использованием праймеров 642f и 1445g нами были получены продукты амплификации размером ~800 п.н. С целью обнаружения полиморфизма ДНК у исследованных штаммов клубеньковых бактерий продукты амплификации обрабатывали ферментом — эндонуклеазой рестрикции *MspI*, которая

«узнает» в молекуле ДНК нуклеотидную последовательность 5'-CCGG-3'. В результате расщепления продукта амплификации было выявлено, что, несмотря на высокую фенотипическую гетерогенность данных брадиризовий, по RFLP-профилю гена 16S рРНК штаммы оказались однородны (рис. 1).

Анализ секвенированных последовательностей гена 16S рРНК показал 100% сходство по этому маркеру штаммов с интенсивным ростом (*Bradyrhizobium* sp. KB11, *Bradyrhizobium* sp. KC19, *Bradyrhizobium* sp. KC22) и штамма *B. japonicum* USDA 127 (AF208508). Наряду с этим медленно растущие штаммы *B. japonicum* 46 и *B. japonicum* KH10 продемонстрировали 100% сходство с типовым штаммом *B. japonicum* USDA 6^T (AB231927), а штамм *B. japonicum* KC23 — 100% сходство со штаммом *B. japonicum* USDA 4 (AF208515) (табл. 1). Нуклеотидный полиморфизм между референтными штаммами USDA 127, USDA 6 и USDA 4 обусловлен 4 нуклеотидными заменами. Для каждого вида клу-

Таблица 1

Общая характеристика исследуемых клубеньковых бактерий сои с различной скоростью роста

Штамм (род/вид)	Географическое происхождение	Рост на агаризованной среде	Группа штаммов	Сходство по 16S рРНК, %	Сходство по ITS, %
<i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T	Япония	Медленный	<i>B. japonicum</i> USDA 6	100	—
<i>B. japonicum</i> 46	Украина, Винницкая обл.	Медленный	<i>B. japonicum</i> USDA 6	100	875/883 (99,1%)
<i>B. japonicum</i> KH10	Украина, Черниговская обл.	Медленный	<i>B. japonicum</i> USDA 6	100	875/883 (99,1%)
<i>B. japonicum</i> KC23	Украина, Сумская обл.	Медленный	<i>B. japonicum</i> USDA 4	100	876/884 (99,1%)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. KB11	Украина, Винницкая обл.	Интенсивный	<i>B. japonicum</i> USDA 127	100	873/875 (99,8%)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. KC19	Украина, Сумская обл.	Интенсивный	<i>B. japonicum</i> USDA 127	100	873/875 (99,8%)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. KC22	Украина, Сумская обл.	Интенсивный	<i>B. japonicum</i> USDA 127	100	873/875 (99,8%)

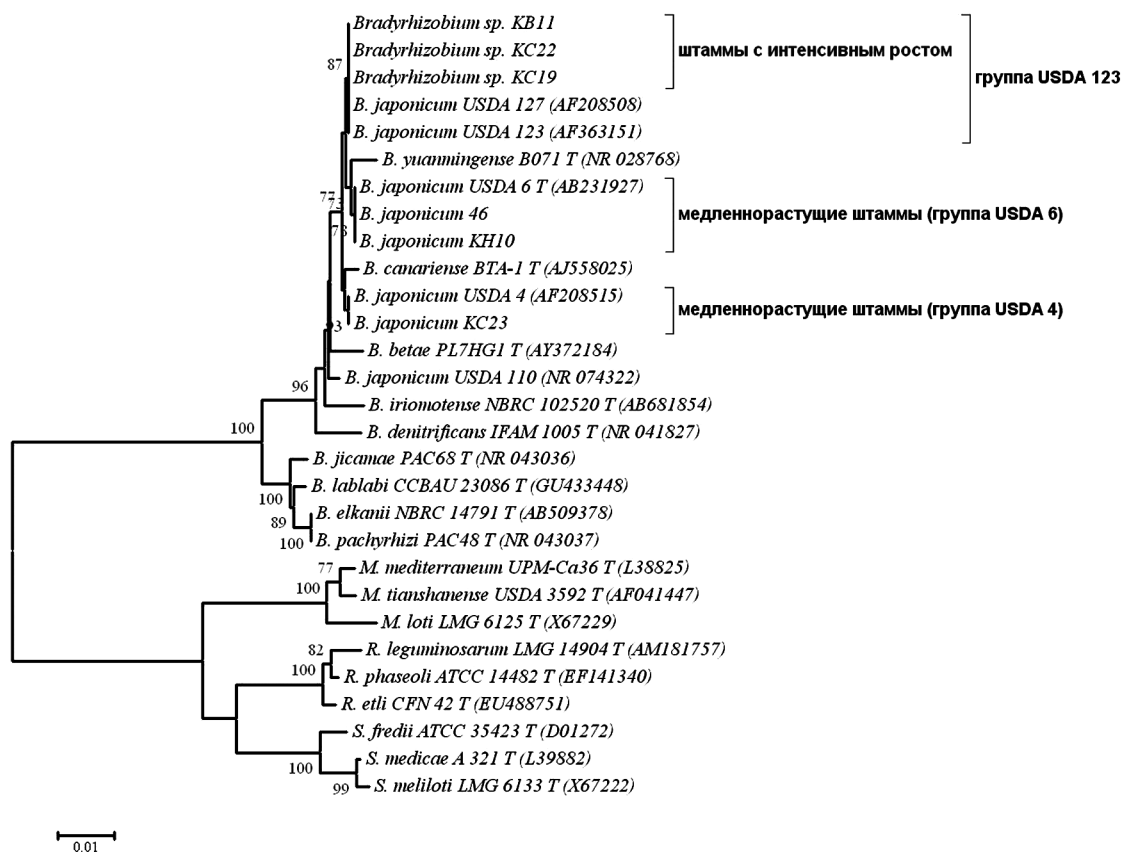


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе данных сравнительного анализа полных нуклеотидных последовательностей 16S рРНК клубеньковых бактерий родов *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* и *Mesorhizobium* с использованием алгоритма Neighbor-Joining. Масштаб соответствует 1 замене на 100 пар оснований (эволюционным расстоянием). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap» — анализа 1000 альтернативных деревьев

беньковых бактерий рода *Bradyrhizobium* в базе данных NCBI были найдены последовательности гена 16S рРНК типовых штаммов, которые также были взяты для анализа. В качестве удаленных контролей были использованы ДНК-последовательности 16S рРНК типовых штаммов родов *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* и построено филогенетическое дерево (рис. 2).

Для дифференциации штаммов ризобий сои с разной скоростью роста на внутривидовом уровне мы использовали рестрикционный анализ амплифицированной с использованием праймеров FGPS1490–72 и FGPL132–38 последовательности межгенного региона 16S-23S рРНК (ITS). Известно, что у клубеньковых бактерий рода *Bradyrhizobium* рибосомальный 16S-23S-5S рРНК оперон, в отличие от ризобий других родов, представлен в геноме только одной копией, что исключает вероятность получения продуктов амплификации разной длины и нуклеотидного состава, как например, в случае с бактериями рода *Rhizobium* (Зотов и др., 2012). Размер целевого фрагмента у всех исследованных штаммов клубеньковых бактерий сои составлял около 1000 п. н. После обработки межгенного спейсера

рестриктазой *MspI* было показано разделение клубеньковых бактерий сои на две группы: к первой группе отнесены штаммы с интенсивным ростом, а во вторую группу объединены медленнорастущие штаммы, имевшие схожий паттерн с типовым штаммом *B. japonicum* USDA 6^T (рис. 3). Кроме того, нами была определена длина фрагментов рестрикции. Из данных таблицы 2 видно, что у штаммов клубеньковых бактерий сои с медленным и интенсивным ростом совпадают по размеру только два фрагмента — ~220 п. н. и ~150 п. н. Очевидно, у штаммов первой группы в амплифицируемом фрагменте присутствует дополнительный сайт узнавания *MspI*, отсутствующий у штаммов второй группы, что, вероятнее всего, вызвано единственной нуклеотидной заменой.

Таким образом, при изучении структуры межгенного региона 16S-23S рРНК нам впервые удалось выявить два генотипа микросимбионтов сои в почвах Украины, что свидетельствует о генетическом полиморфизме данного региона у клубеньковых бактерий, отличающихся скоростью роста. К первому ITS-типу отнесены штаммы с интенсивным ростом *Bradyrhizobium* sp. KB11, *Bradyrhizobium* sp. KC19, *Bradyrhizobium* sp.

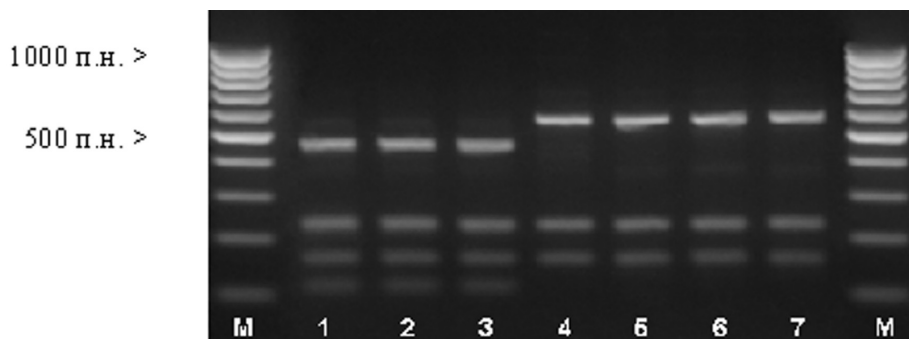


Рис. 3. Электрофоретический анализ продуктов рестрикции эндонуклеазой *MspI* межгенного региона 16S-23S рРНК клубеньковых бактерий сои. М — маркер молекулярного веса М100; 1, 2, 3 — штаммы ризобий сои с интенсивным ростом (KB11, KC19, KC22); 4 — типовой штамм *B. japonicum* USDA 6^T; 5, 6, 7 — медленно растущие штаммы ризобий сои (46, KC23, KH10)

KC22, а ко второму ITS-типу отнесены медленно растущие штаммы *B. japonicum* 46, *B. japonicum* KC23, *B. japonicum* KH10. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данный генетический маркер может быть одним из критериев дифференциации представителей почвенных популяций микросимбионтов сои.

Опираясь на полученные результаты, следующим этапом работы было определение нуклеотидных последовательностей межгенного региона 16S-23S рРНК исследуемых микросимбионтов сои, а также проведение их сравнительного анализа. В совокупности с нуклеотидными последовательностями типовых штаммов клубеньковых бактерий различных видов рода *Bradyrhizobium* из GenBank было построено филогенетическое дерево (рис. 4).

Анализ ITS последовательностей исследованных медленно растущих штаммов показал, что они формируют две достоверно различающихся группы (два кластера). Кластер I образовали штаммы *B. japonicum* 46, KH10 и типовой штамм *B. japonicum* USDA 6^T (группа USDA 6), а кластер II включал штамм *B. japonicum* KC23 и штамм *B. japonicum* USDA 4 (группа USDA 4).

В отличие от медленно растущих микросимбионтов сои, штаммы с интенсивным ростом (*Bradyrhizobium* sp. KB11, KC19, KC22) разного эколого-географического

происхождения объединяются в один кластер и образуют обособленную филогенетическую группу штаммов. Особого внимания заслуживает тот факт, что секвенированные последовательности 16S-23S рДНК этих штаммов имеют высокий уровень сходства с аналогичными последовательностями штаммов *B. japonicum* USDA 127 (сходство 99,8 %) и *B. japonicum* USDA 123 (сходство 99,5 %) из GenBank, которые относятся к известной, по литературным данным, серогруппе 123. Отличительной особенностью этих штаммов является повышенная сапрофитная компетентность, то есть способность клубеньковых бактерий выживать в почве вне растения-хозяина. Факт доминирования этих штаммов в клубеньках впервые был установлен рядом исследователей в США в многочисленных полевых опытах на разных почвах. Так, при анализе более 600 клубеньков сои, произраставшей в 75 местах штата Айова, было установлено, что штаммы ризобий сои серогруппы 123 преобладали, образуя на корнях от 52 % до 97 % клубеньков (Ham et al., 1971). При изучении местных популяций ризобий сои в почвах Бразилии и Польши также показано доминирование бактерий серогруппы 123 (Godoy et al., 2008; Madrzak et al., 1995).

Важно отметить, что в предыдущих исследованиях с интенсивно растущими штаммами клубеньковых бактерий сои нами получены аналогичные результаты. С по-

Таблица 2

ITS-типы и рестрикционные паттерны, полученные в ПЦП-анализе 16S-23S рДНК клубеньковых бактерий сои (обработка рестриктазой *MspI*)

№ з/п	Первый ITS-тип			Второй ITS-тип			
	Штаммы с интенсивным ростом			Медленно растущие штаммы			
	KB11	KC19	KC22	USDA 6 ^T	46	KC23	KH10
	Ориентировочный размер фрагментов (п.н.)						
1				590	590	590	590
2	460	460	460				
3	220	220	220	220	220	220	220
4	150	150	150	150	150	150	150
5	110	110	110				

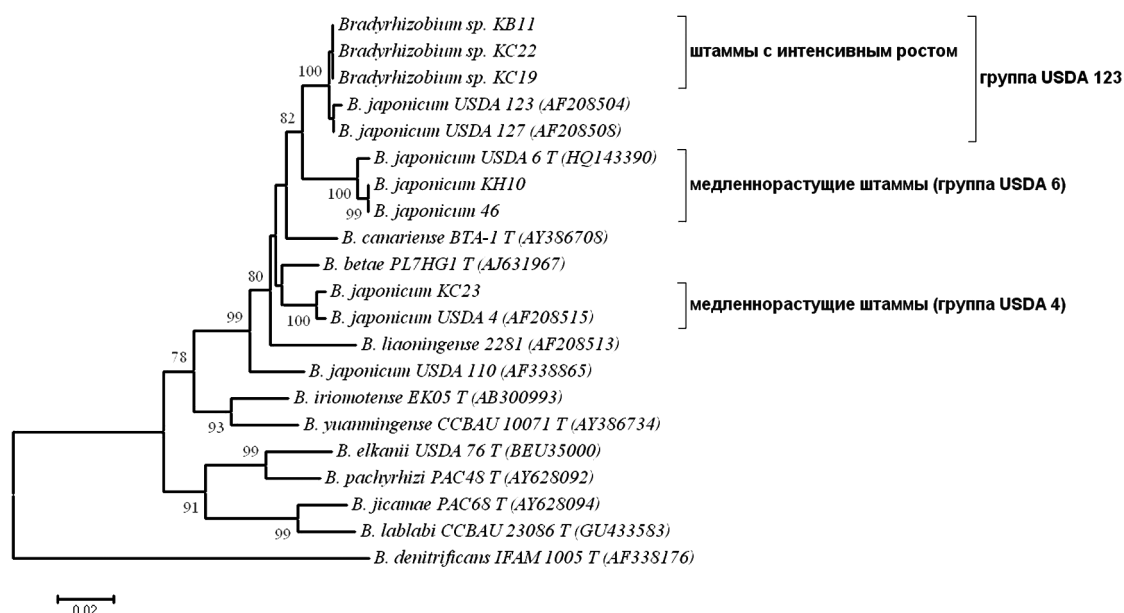


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное на основе данных сравнительного анализа последовательностей межгенного региона 16S-23S рПНК (ITS) клубеньковых бактерий рода *Bradyrhizobium* sp. с использованием алгоритма Neighbor-Joining. Масштаб соответствует 2 заменам на 100 пар оснований (эволюционным расстояниям). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap» — анализа 1000 альтернативных деревьев

мощью серологического метода была проанализирована популяция ризобий, сформированная 8–10 лет назад при выращивании сои, инокулированной медленнорастущими штаммами и штаммами с интенсивным ростом. В ходе исследований обнаружено, что основная часть клубеньков на корнях культурной сои (60–73 % в среднем за последние три года) была образована интенсивнорастущими ризобиями серогруппы KB11 (первый ITS-тип). Данный факт послужил доказательством их более высокой приживаемости в почве, по сравнению с медленнорастущими штаммами (Крутило, Волкова, 2012).

Исходя из вышесказанного, а также согласно результатам секвенирования гена 16S рПНК и межгенного ITS-региона, интенсивнорастущие штаммы — микросимбионты сои разного эколого-географического происхождения, оказались близки ризобиям группы USDA 123 (сходство 100 % по гену 16S рПНК и 99,5–99,8 % по межгенному ITS-региону) и, следовательно, могут быть отнесены к виду *B. japonicum*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами впервые проведена оценка генотипических свойств микросимбионтов сои с медленным и интенсивным ростом, распространённых в почвах Украины. На основании фенотипического и генотипического (16S рПНК и 16S-23S рПНК) сходства медленнорастущих штаммов клубеньковых бактерий сои с типовым штаммом *B. japonicum* USDA 6^T подтверждена их принадлежность к виду *B. japonicum*. Поскольку штаммы

с интенсивным ростом по последовательности гена 16S рПНК на 99,7 % сходны с типовым штаммом, а по последовательности межгенного ITS-региона наиболее близки к штамму *B. japonicum* USDA 127 (сходство 99,8 %) широко известной серогруппы 123, это позволило сделать вывод о принадлежности интенсивнорастущих штаммов также к виду *B. japonicum*.

Основываясь на результатах рестрикционного анализа межгенного региона, исследованные ризобии сои были разделены на два ITS-типа, которые соответствуют распределению штаммов на физиологические группы. Согласно результатам секвенирования нуклеотидных последовательностей ITS ризобии сои с разной скоростью роста образуют 3 достоверно различающихся кластера, два из которых включают медленнорастущие штаммы (группа USDA 6 и USDA 4), а третий формируют интенсивнорастущие микросимбионты сои (группа USDA 123).

Полученные нами данные, относительно генетического разнообразия микросимбионтов сои в почвах Украины, согласуются с результатами исследователей других стран, которые также указывают на существование разных ITS-типов клубеньковых бактерий сои в почвах с различной интенсивностью выращивания культурной сои (Madrzak et al., 1995; Saeki et al., 2007; Jaiswal et al., 2012).

Следует отметить, что большинство работ по оценке разнообразия и структуры популяций клубеньковых бактерий сои проводились с использованием штаммов, выделенных из местных многочисленных популяций ризобий, которые сформировались в регионах интенсивного выра-

щивания сои (van Berkum and Fuhrmann, 2000; Appunu et al., 2008; Jaiswal et al., 2012). Значительно меньше внимания уделялось изучению биоразнообразия ризобий сои в относительно молодых популяциях, которые формируются в почвах, не содержащих местных специфических бактерий. Вместе с тем обнаружение и часто доминирование клубеньковых бактерий сои группы USDA 123 в почвах стран как традиционного выращивания сои (Китай, Индия, Япония), так и стран, где соя является относительно новой культурой (Украина, Польша), является весьма интересным фактом, требующим особого внимания (Madrzak et al., 1995; Saeki et al., 2007; Jaiswal et al., 2012; Крутило, Волкова, 2012). Вполне вероятно, что в ходе коэволюции симбиотических партнеров некоторые генотипы клубеньковых бактерий могли приобрести способность к повышенному выживанию в почве и преимущественному инфицированию растения-хозяина.

Особый интерес представляет вопрос о распространении штаммов с интенсивным ростом (группы USDA 123) в почвах Украины, учитывая то, что на момент выделения данных штаммов в качестве инокулянтов использовалось ограниченное количество биопрепаратов, биоагентами которых были медленно растущие клубеньковые бактерии сои (Ризоторфин). Даже если предположить, что в определенном регионе страны интенсивно растущие штаммы были интродуцированы в почву, остается открытым вопрос о распространении этих штаммов в другие регионы.

Полученные результаты демонстрируют необходимость дальнейшего детального анализа популяций клубеньковых бактерий сои в агроценозах культурной сои с привлечением новых методов. Изучение ризобий сои с интенсивным ростом позволит расширить наши знания о формировании биоразнообразия и природного потенциала местных популяций микросимбионтов относительно новой для Украины культуры — сои.

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов выражает искреннюю благодарность руководителю отделения геномных технологий Центра коллективного пользования научным оборудованием «Геномные технологии и клеточная биология» Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, к. б. н., Андронову Евгению Евгеньевичу за помощь в проведении рестрикционного анализа, обсуждение полученных результатов и ценные советы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабич А. О. (1993) **Сучасне виробництво і використання сої**. К.: Урожай. 432 с.
2. Зотов В. С., Пунина Н. В., Хапчаева С. А. и др. (2012) **Новый таксономический маркер клубень-**

3. **ковых бактерий рода Rhizobium и его эволюция. Экологическая генетика.** Т. 10(2): С. 50–63.
3. Коростик Е. В., Пинаев А. Г., Ахтемова Г. А., Андронов Е. Е. (2006) **Универсальные 16S rRNA праймеры для описания генетического разнообразия сообщества почвенных прокариот. Экологическая генетика.** Т. 4(4): С. 32–37.
4. Крутило Д. В., Волкова И. В. (2012) **Серологічне різноманіття бульбочкових бактерій сої у ґрунтах України. Агроекологічний журнал.** № 4: С. 66–71.
5. Крутило Д. В., Надкернична О. В., Ковалевська Т. М., Патики В. П. (2008) **Біологічна різноманітність бульбочкових бактерій сої в ґрунтах України. Мікробіол. журн.** Т. 70(6): С. 27–34.
6. Патики В. П., Крутило Д. В., Надкернична О. В. та ін. (2010) **Фенотипні та генотипні ознаки бульбочкових бактерій сої, поширених у ґрунтах України. Доповіді НАН України.** № 8: С. 167–172.
7. Патики В. П., Коць С. Я., Волкогон В. В. та ін. (2003) **Біологічний азот / за ред. В. П. Патики.** К.: Світ. 424 с.
8. Толкачев Н. З. (1990) **Модифицированный метод определения количества клубеньковых бактерий сои в почве.** Тр. ВНИИСХМ. Т. 60; С. 37–43.
9. Толкачев Н. З. (1997) **Потенциальные возможности симбиотической азотфиксации при выращивании сои на юге Украины. Мікробіол. журн.** Т. 59(4): С. 34–41.
10. Altschul S. F., Gish W., Miller W. et al. (1990) **Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol.** V. 215(2): P. 403–410.
11. Appunu C., N'Zoue A., Laguerre G. (2008) **Genetic diversity of native Bradyrhizobia isolated from soybeans (Glycin max L.) in different agricultural–ecological–climatic regions of India. Appl. Environ. Microbiol.** V. 74: P. 5991–5996.
12. Beringer J. E. (1974) **R1 transfer in Rhizobium leguminosamm. J. Gen. Microbiol.** V. 84: P. 188–198.
13. Chen W., Wang E., Wang S. et al. (1995) **Characteristics of Rhizobium tianshanense sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, people's republic of China. Int. J. Syst. Bacteriol.** V. 45(1): P. 153–159.
14. Chen W. X., Yan G. H., Li J. L. (1988) **Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that Rhizobium fredii be assigned to Sinorhizobium gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol.** V. 38(4): P. 392–397.
15. Godoy L. P., Vasconcelos A. T. R., Chueire L. M. O. et al. (2008) **Genomic panorama of Bradyrhizobium japonicum CPAC 15, a commercial inoculant strain largely established in Brazilian soils and belonging to the same serogroup as USDA 123. Soil Biology and Biochemistry.** V. 40(11): P. 2743–2753.

16. Hall T.A. (1999) **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucl. Acids. Symp. Ser.* V. 41: P. 95–98.
17. Ham G.E., Frederick L.R., Anderson I.C. (1971) **Serogroups of Rhizobium japonicum in soybean nodules sampled in Iowa.** *Agronomy Journal.* V. 63(1): P. 69–72.
18. Jaiswal S.K., Anand A., Dhar B., Vaishampayan A. (2012) **Genotypic characterization of phage-typed indigenous soybean Bradyrhizobia and their host range symbiotic effectiveness.** *Microbiol. Ecol.* V. 63(1): P. 116–126.
19. Jordan D.C. (1982) **Transfer of Rhizobium japonicum Buchanan 1980 to Bradyrhizobium gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants.** *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 32: P. 136–139.
20. Keyser H.H., Cregan P.B. (1987) **Nodulation and Competition for nodulation of selected soybean genotypes among Bradyrhizobium japonicum serogroup 123 isolates.** *Appl Environ. Microbiol.* V. 53(11): P. 2631–2635.
21. Kumar S., Tamura K., Nei M. (2004) **MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment.** *Briefings in Bioinformatics.* V. 5: P. 150–163.
22. Laguerre G. (1992) **Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of Rhizobium leguminosarum bv. viceae in field populations.** *FEMS Microbiol. Ecol.* V. 10: P. 17–26.
23. Madrzak C.J., Golinska B., Krolczak J., et al. (1995) **Diversity among Field Populations of Bradyrhizobium japonicum in Poland.** *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 61(4): P. 1194–1200.
24. Nei M., Kumar S. (2000) **Molecular evolution and phylogenetics.** New York: Oxford University Press. 336 p.
25. Normand P., Ponsonnet C., Nesme X., et al. (1996) **ITS analysis of prokaryotes.** *Molec. Microbial Ecology Manual.* V. 5(3.4): P. 1–12.
26. Ponsonnet C., Nesme X. (1994) **Identification of Agrobacterium strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions.** *Arch. Microbiol.* V. 161: P. 300–309.
27. Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / под ред. Спайнка Г., Кондороши А., Хукаса П. Пер. с англ. С-Пб.: Бионт. 2002. 558 с.
28. Saeki Y., Murata T., Yamakawa T., Akao S. (2007) **Differentiation of soybean-nodulating Bradyrhizobium USDA strains using restriction fragment length polymorphism analysis of 23S–5S rRNA genes.** *Soil Science and Plant Nutrition.* V. 53: P. 562–567.
29. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994) **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nuc. Ac. Res.* V. 22: P. 4673–4680.
30. Van Berkum P., Fuhrmann J.J. (2000) **Evolutionary relationships among the soybean Bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence.** *Int. J. Syst. EV. Microbiol.* V. 50: P. 2165–2172.
31. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. (1991) **16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study.** *J. Bacteriol.* V. 173: P. 697–703.
32. Willems A. (2006) **The taxonomy of rhizobia: an overview.** *Plant and Soil.* V. 287: P. 3–14.
33. Xu L.M., Ge C., Cui Z. et al. (1995) **Bradyrhizobium liaoningense sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans.** *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 45: P. 706–711.

GENOTYPIC ANALYSIS OF NODULE BACTERIA NODULATING SOYBEAN IN UKRAINE SOILS

Krutylko D. V., Zotov V. S.

✳ **SUMMARY: Background.** Distribution of root nodule bacteria of soybean in soils of Ukraine is the result of intensive cultivation of soybeans over the last 20 years. During the observation the structure of soybean rhizobia populations for the first time we have determined the strains which significantly differ in phenotypic properties from typical slow-growing bacteria of *B. japonicum* species previously described. These strains are characterized by high speed growth and we tentatively called them “stains with intensive growth”. The aim of our work was to investigate the genotypic properties of microsymbionts of soybeans with different rates of growth spreading in soils of Ukraine. **Materials and methods.** The 16S rRNA gene and intergenic 16S-23S rRNA region of six strains – typical representatives of soybean nodule bacteria with slow- and intensive growth-rates was carried out. The strains were picked up from different Ukrainian soils. **Results.** Analysis of the 16S rRNA nucleotide sequences showed the 100% similarity of slow-growing strains to *B. japonicum* USDA 6^T and USDA 4 ones. This analysis proved propinquity of strains with intensive growth to the strain *B. japonicum* USDA 127 (USDA 123 group). Representatives of this group possessed increased saprophytic competence so as the examined strains. With use of restriction analysis of ITS intergenic region soybean rhizobia were divided among two ITS types: 1st ITS type — strains with intensive growth, 2nd ITS type — slow- growing strains. According to results of ITS-region sequencing soybean rhizobia form 3 reliably different clusters: two of which include slow-growing strains (group USDA 6 and USDA 4), and a third include soybean microsymbionts with intensive growth (USDA 123 group). **Conclusion.** On the basis of phenotypic and genotypic (16S rRNA and 16S-23S rRNA) analysis all of the investigated soybean strains of root nodule bacteria were related to the *Bradyrhizobium japonicum* species. The division of strains by the structure of the ITS-region into two genotypes corresponds to the division of strains into two physiological groups: the strains of an intense and slow growth.

✳ **KEY WORDS:** *Bradyrhizobium japonicum*, 16S rRNA, 16S-23S rRNA (ITS), RFLP-analysis, DNA sequencing, *Glycine max.*

* REFERENCES (TRANSLITERATE)

1. Altschul S. F., Gish W., Miller W. et al., (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* V. 215: P. 403–410.
2. Appunu C., N'Zoue A., Laguerre G., (2008) Genetic diversity of native Bradyrhizobia isolated from soybeans (*Glycin max* L.) in different agricultural–ecological–climatic regions of India. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 74: P. 5991–5996.
3. Babich A. O. **Suchasne virobnitstvo i vikoristannya soi [Modern production and use of soybean].** Kyiv, **Urozhaj.** 1993. 432 p.
4. Beringer J. E. (1974) R1 transfer in *Rhizobium leguminosamm.* *J. Gen. Microbiol.* V. 84: P. 188–198.
5. Chen W., Wang E., Wang S. et al. (1995) Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, people's republic of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 45(1): P. 153–159.
6. Chen W. X., Yan G. H., Li J. L. (1988) Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 38(4): P. 392–397.
7. Godoy L. P., Vasconcelos A. T. R., Chueire L. M. O. et al. (2008) Genomic panorama of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15, a commercial inoculant strain largely established in Brazilian soils and belonging to the same serogroup as USDA 123. *Soil Biology and Biochemistry.* V. 40(11): P. 2743–2753.
8. Hall T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* V. 41: P. 95–98.
9. Ham G. E., Frederick L. R., Anderson I. C. (1971) Serogroups of *Rhizobium japonicum* in soybean nodules sampled in Iowa. *Agronomy Journal.* V. 63(1): P. 69–72.
10. Jaiswal S. K., Anand A., Dhar B., Vaishampayan A. (2012) Genotypic characterization of phage-typed indigenous soybean Bradyrhizobia and their host range symbiotic effectiveness. *Microbiol. Ecol.* V. 63(1): P. 116–126.
11. Jordan D. C. (1982) Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 32: P. 136–139.
12. Keyser H. H., Cregan P. B. (1987) Nodulation and Competition for nodulation of selected soybean genotypes among *Bradyrhizobium japonicum* serogroup 123 isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 53(11): P. 2631–2635.
13. Korostik E. V., Pinaev A. G., Akhtemova G. A., Andronov E. E. (2006) **Universalnye 16S rRNA praimeryi dlya opisaniya geneticheskogo raznoobraziya soobshchestva pochvennyih prokariot [Universal 16S rRNA primers BD1 for soil microbial community analysis].** *Ecological genetics («Ekologicheskaja genetika»).* V. 4(4): P. 32–37.
14. Krutylo D. V., Volkova I. V. (2012) **Serologichne riznomanittya bulbochkovih bakteriy soi u gruntah Ukrayini [Serological diversity of soybean nodule bacteria in Ukraine soils].** *Agroecological journal.* № 4: P. 66–71.
15. Krutylo D. V., Nadkernychna O. V., Kovalevska T. M., Patyka V. P. (2008) **Biologichna riznomanitnist bulbochkovih bakteriy soi v gruntah Ukrayini [Biological diversity of soybean nodule bacteria in soils of Ukraine].** *Microbiologichny zhurnal.* V. 70(6): P. 27–34.
16. Kumar S., Tamura K., Nei M. (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics.* V. 5: P. 150–163.
17. Laguerre G. (1992) Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae in field populations. *FEMS Microbiol. Ecol.* V. 10: P. 17–26.
18. Madrzak C. J., Golinska B., Kroliczak J., et al., 1995. Diversity among Field Populations of *Bradyrhizobium japonicum* in Poland. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 61(4): P. 1194–1200.
19. Nei M., Kumar S. (2000) Molecular evolution and phylogenetics. New York: Oxford University Press. 336 p.
20. Normand P., Ponsonnet C., Nesme X. et al. (1996) ITS analysis of prokaryotes. *Molec. Microbial Ecology Manual.* V. 5(3.4): P. 1–12.
21. Ponsonnet C., Nesme X. (1994) Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. *Arch. Microbiol.* V. 161: P. 300–309.
22. Patyka V. P., Krutylo D. V., Nadkernychna O. V., et al. (2010) **Fenotipni ta genotipni oznaki bulbochkovih bakteriy soi, poshirenih u gruntah Ukrayini [Phenotypic and genotypic signs of soybean nodule bacteria widespread in soils of Ukraine].** *Reports of NAS of Ukraine.* № 8: P. 167–172.
23. Patyka V. P., Kots S. Ya., Volkogon V. V. et al. (2003) **Biologichniy azot [Biological nitrogen].** V. P. Patyka (eds.). Kyiv, Svit. 424 p.
24. Spaink H., Kondorosi A., Hooykaas P. (2002) *Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria/transl. from English.* I. A. Tikhonovich, N. A. Provorov. St. Peterburg, IPK — Biont. 558 p.
25. Saeki Y., Murata T., Yamakawa T., Akao S. (2007) Differentiation of soybean-nodulating *Bradyrhizobium* USDA strains using restriction fragment length polymorphism analysis of 23S-5S rRNA genes. *Soil Science and Plant Nutrition.* V. 53: P. 562–567.
26. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progres-

- sive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Ac. Res.* V. 22: P. 4673–4680.
27. Tolkachov N. Z. (1990) **Modifitsirovanyiy metod opredeleniya kolichestva klubenkovyih bakteriy soi v pochve [A modified method of determining the amount of soybean root nodule bacteria in the soil]**. *ARRIAM works («trudy VNIISHM»)*. V. 60: P. 37–43.
28. Tolkachov N. Z. (1997) **Potentsialnyie vozmozhnosti simbioticheskoy azotfiksatsii pri vyiraschivanii soi na yuge Ukrainyi [Potentialities of soybean symbiotic nitrogen fixation in the south of Ukraine]**. *Microbiologichny zhurnal*. V. 59(4): P. 34–41.
29. Van Berkum P., Fuhrmann J. J. (2000) Evolutionary relationships among the soybean Bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. *Int. J. Syst. EV. Microbiol.* V. 50: P. 2165–2172.
30. Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* V. 173: P. 697–703.
31. Willems A. (2006) The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and Soil*. V. 287: P. 3–14.
32. Xu L. M., Ge C., Cui Z. et al. (1995) Bradyrhizobium liaoningense sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *International Journal Syst. Bacteriol.* Vol. 45: P. 706–711.
33. Zotov V. S., Punina N. V., Khapchaeva S. A. et al. (2012) **Novyyi taksonomicheskii marker klubenkovyih bakteriy roda Rhizobium i ego evolyutsiya [The new taxonomic marker of nodulation bacteria of Rhizobium genus and its evolution]**. *Ecological genetics («Ekologicheskaja genetika»)*. V. 10(2): P. 50–63.

✪ Информация об авторах

Крутило Дмитрий Валериевич — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории растительно-микробных взаимодействий. Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН. 14027, Украина, Чернигов, ул. Шевченко, д. 97. E-mail: krutilod@mail.ru.

Зотов Василий Сергеевич — младший научный сотрудник лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота. Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН. 119071, Москва, Ленинский пр.-т., д. 33. E-mail: adni83@yandex.ru.

Krutylo Dmitriy Valeriyevich — Ph.D., senior research scientist, Laboratory of plant-microbial interactions, Institute of Agricultural Microbiology and Agro-industrial Manufacture, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine. 14027, Chernigov, Shevchenko St., 97. Ukraine. E-mail: krutilod@mail.ru.

Zotov Vasily Sergeevich — junior research scientist, Laboratory of biochemistry of nitrogen fixation and nitrogen metabolism. A. N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences. 119071, Moscow, Leninskiy prospekt, 33. Russia. E-mail: adni83@yandex.ru.