



© А. Н. Мунтян, Е. Е. Андронов,  
В. С. Белова, М. Л. Румянцева,  
Б. В. Симаров

ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии

## СОПРЯЖЕННЫЕ СИМБИОТИЧЕСКИЕ ПОПУЛЯЦИИ. ЧАСТЬ I: АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ РИЗОБИАЛЬНОГО КОМПОНЕНТА

### ВВЕДЕНИЕ

✿ В статье приводятся результаты изучения сопряженной коллекции бобово-ризобиальной симбиотической системы (коллекция растений-хозяев люцерны и донника и выделенных из этих растений ризобий). Анализ таких коллекций делает возможным понимание коэволюционных процессов в симбиотической системе. Приведены результаты анализа ризобиального компонента симбиотической системы: определен генетический полиморфизм по 6 геномным локусам — хромосомным и симбиотическим. Проведен анализ таких популяционных характеристик, как таксономическая структура популяции, гетерогенность популяции по участкам ризобиального генома, дифференциация популяции по отдельным участкам генома, а также неравновесие по сцеплению между генетическими маркерами. Проанализированы различия между ризобиями, выделенными из различных растений-хозяев, а также между клубеньковыми и почвенными изолятами.

✿ **Ключевые слова:** сопряженная коллекция; популяция клубеньковых бактерий; генетический полиморфизм; *Sinorhizobium meliloti*.

Поступила в редакцию 07.11.2011.  
Принята к публикации 10.02.2012.

Симбиоз бобовых растений с клубеньковыми бактериями — одна из наиболее эффективных систем биологической азотфиксации, имеющая огромное экологическое и практическое значение, и, кроме того, растительно-микробные взаимоотношения служат прекрасными моделями для выяснения ряда фундаментальных и прикладных вопросов биологии (Тихонович, Проворов, 2009). Такой симбиоз можно рассматривать, как коадаптивную систему, состоящую из различных взаимосвязанных и взаимозависимых таксонов, сформировавшихся в процессе длительной совместной эволюции. Они объединены тесными экологическими связями, но в них не происходит обмен генетическим материалом. В них действует взаимное (реципрокное) давление отбора, приводящее к тому, что эволюция каждого таксона хотя бы частично зависит от эволюции другого (Острроверхова, Острроверхова, 2007).

Использование филогенетических, популяционно-генетических и молекулярных подходов позволяет изучать симбиоз как продукт коэволюции партнеров, которая представляет собой совокупность макро- и микроэволюционных процессов, осуществляемых в генетически интегрированных биосистемах (Проворов, 2001 а). Однако при изучении совместного влияния друг на друга природных симбиотических систем, представленных бобовыми растениями и бактериальными клетками (ризобиями), как правило, пристальное внимание уделяется одному из партнеров. Таким образом, назрела необходимость в комплексном подходе по изучению механизмов симбиотического взаимодействия, где одновременно в качестве анализируемых моделей будут выступать оба партнера растительно-микробной системы.

В данной работе был применен комплексный подход по созданию сопряженной коллекции бобово-ризобиального симбиоза. Под сопряженной коллекцией нами понимается такая коллекция, где основной анализируемой единицей является комплекс, включающий в себя, как и растение-хозяина, так и бобового симбионта, выделенного непосредственно из клубенька, сформированного на данном растении. В качестве основы для сопряженной коллекции была взята группа перекрестной инокуляции люцерны, в которую входят роды люцерны (*Medicago*), донник (*Melilotus*) и пажитник (*Trigonella*), вступающие в симбиоз с *Sinorhizobium meliloti* и *Sinorhizobium medicae* (Проворов, Симаров, 1984 б). Были выбраны 2 растения (*Melilotus albus* и *Medicago lupulina*), относящиеся к симбиотически неспециализированным видам, вступающие в эффективный симбиоз с *S. meliloti*. Ранее уже было показано, что несмотря на принадлежность к одной и той же группе перекрестной инокуляции, наблюдается некоторая генетическая дифференциация ризобий по симбиотическим районам ризобиального генома, выделенных из клубеньков люцерны и донника (Андронов и др., 1999). Из опубликованных данных очевидна определяющая роль

растения-хозяина в формировании генетической структуры популяций ризобий. Однако детальное изучение этой проблемы предполагает одновременный анализ разнообразия как в растительной, так в ризобиальных популяциях. К сожалению, таким работам уделяется мало внимания. Поэтому в настоящей работе и было предпринято комплексное исследование, предполагающее одновременный анализ как растительного, так и ризобиального компонентов. Специальная процедура формирования коллекции предполагала выделение ризобий как из клубеньков растений, образованных «в поле» (клубеньковые изоляты), так и из образцов почвы при инокуляции стерильных проростков почвенными болтушками (почвенные изоляты) для оценки различий между ними.

По причине большого количества экспериментально-го материала полученные результаты будут изложены в нескольких публикациях. В данной части представлены результаты анализа генетического разнообразия ризобиального компонента сопряженной системы. В следующих публикациях будут представлены результаты анализа за растительного компонента и эффетов сопряжения.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Создание сопряженной коллекции.** Для создания сопряженной коллекции природной симбиотической системы сбор образцов проводился на участке невоз-

делываемых почв Северо-Западного региона (территория ВНИИСХМ) летом 2008 года (рис. 1). Для отбора образцов были выбраны 10 сайтов, на которых одновременно произрастали оба растения-хозяина *M. albus* и *M. lupulina*. С каждого сайта было отобрано по 2 растения (*M. albus* и *M. lupulina*), имеющих клубеньки. Одновременно на каждом участке проводили сбор почвенных образцов. Кроме того, по всему району отбора были собраны 2 объединенные коллекции семян растений донника белого и люцерны хмелевидной. Для выделения ризобий из почвы семена из коллекции выбирали случайным образом. Проростки использовали для выделения ризобий из образцов почвы, при этом кроме выделенных ризобий для дальнейшего анализа также сохраняли и растительный материал.

Таким образом, в результате проведенной работы была собрана коллекция, состоящая из дикорастущих (по 10 растений донника и люцерны) и выращенных из семян растений (по 11 растений донника и люцерны), а также ризобий, выделенных из клубеньков всех отобранных растений (табл. 1).

**Выделение ризобий.** Выделение ризобий из клубеньков растений-хозяев проводили по стандартной методике. Клубенек стерилизовали в 96 %-м спирте, промывали, затем растирали в небольшом количестве воды. Полученную суспензию высевали на агаризованную питательную среду ТУ. Для получения

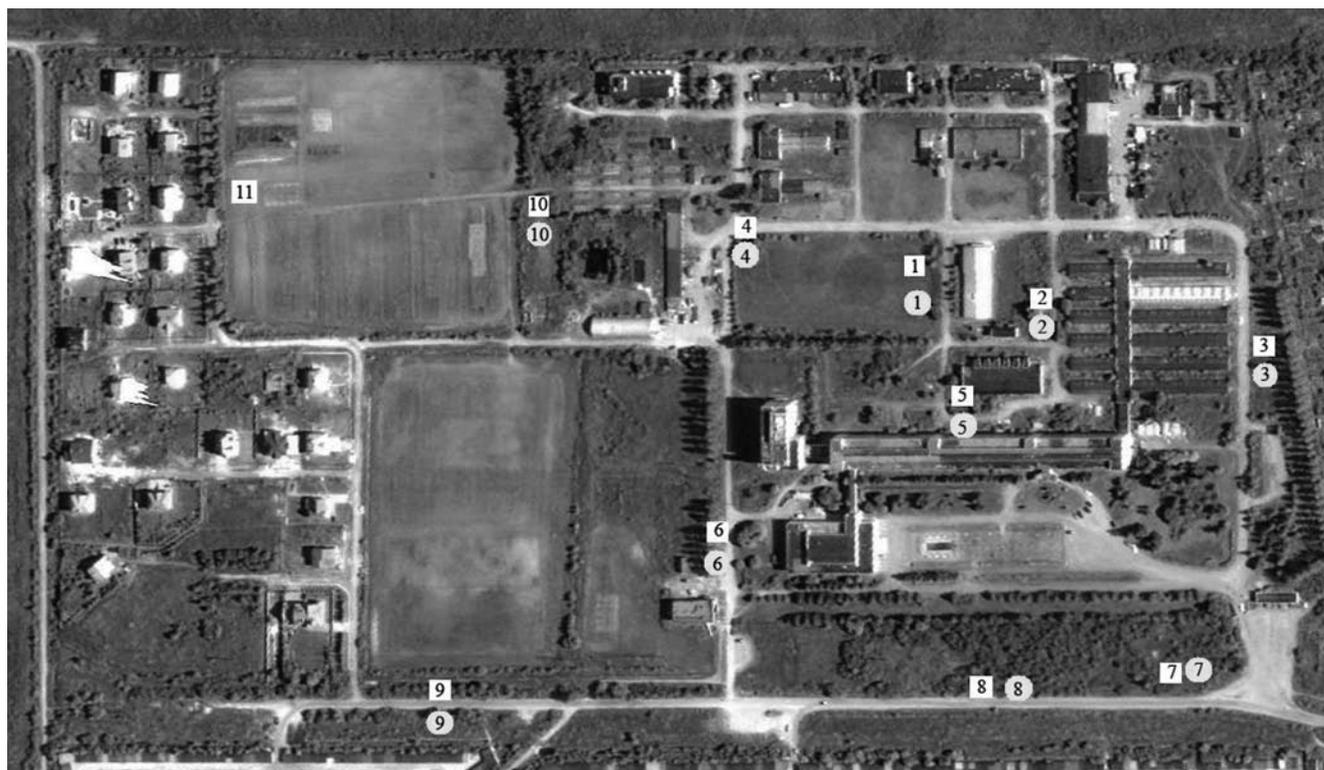


Рис. 1. Схема мест сбора растительных и почвенных образцов на территории ВНИИСХМ: ○ — места сбора растений, □ — места отбора почвенных образцов

Таблица 1

## Сводная таблица клубеньковых и почвенных изолятов, выделенных из люцерны хмелевидной и донника белого

Растение-хозяин	Штамм	Происхождение	Сайт сбора	RFLP-типы					
				хромосома		SymA			
				IGS	<i>leu</i>	<i>fixA</i>	<i>nifD</i>	<i>nodD</i>	<i>nodL-noeA</i>
Люцерна 1	SMED-1	почва	1	G	nd	L	F	E	A
Люцерна 2	SMED-2	почва	2	G	nd	L	F	E	G
Люцерна 3	SMED-3	почва	3	G	nd	L	F	E	A
Люцерна 4	SMEL-4	почва	4	A	A	A	A	A	A
Люцерна 5	SMED-5	почва	5	G	nd	L	F	E	A
Люцерна 6	SMEL-6	почва	6	A	B	B	B	A	A
Люцерна 7	SMEL-7	почва	7	A	B	B	B	A	A
Люцерна 8	SMEL-8	почва	8	A	B	C	B	B	A
Люцерна 9	SMEL-9	почва	9	A	B	B	B	A	A
Люцерна 10	SMED-10	почва	10	G	nd	L	F	E	G
Люцерна 11	SMEL-11	почва	11	A	A	C	B	C	B
Люцерна 12	SMEL-12	клубенек	1	C	nd	D	C	F	C
Люцерна 13	SMED-13	клубенек	3	G	nd	L	F	E	A
Люцерна 14	SMED-14	клубенек	4	G	nd	L	F	E	G
Люцерна 15	SMED-15	клубенек	5	G	nd	L	F	E	A
Люцерна 16	SMEL-16	клубенек	6	B	C	B	B	B	B
Люцерна 17	SMEL-17	клубенек	7	A	A	A	A	A	A
Люцерна 18	SMEL-18	клубенек	9	A	A	I	B	C	B
Люцерна 19	SMEL-19	клубенек	10	D	A	E	D	D	A
Люцерна 20	SMEL-20	клубенек	8	B	C	B	B	A	B
Люцерна 21	SMEL-21	клубенек	2	A	A	B	B	A	A
Донник 1	SMEL1	почва	1	A	B	B	B	A	A
Донник 2	SMEL2	почва	2	A	A	F	D	D	D
Донник 3	SMEL3	почва	3	A	A	F	E	D	D
Донник 4	SMEL4	почва	4	E	B	B	B	A	A
Донник 5	SMED5	почва	5	G	nd	B	B	G	A
Донник 6	SMEL6	почва	6	A	B	H	B	A	A
Донник 7	SMEL7	почва	7	B	C	B	B	B	B
Донник 8	SMEL8	почва	8	A	B	B	B	A	A
Донник 9	SMEL9	почва	9	A	B	C	B	B	A
Донник 10	SMEL10	почва	10	A	B	C	B	B	A
Донник 11	SMEL11	почва	11	A	B	B	B	A	E
Донник 12	SMEL12	клубенек	1	B	C	B	B	B	F
Донник 13	SMEL13	клубенек	2	A	A	I	B	C	B
Донник 14	SMED14	клубенек	3	G	nd	L	F	E	H
Донник 15	SMEL15	клубенек	4	B	C	B	B	A	B
Донник 16	SMEL16	клубенек	5	B	C	B	B	A	B
Донник 17	SMEL17	клубенек	6	A	B	B	B	A	A
Донник 18	SMEL18	клубенек	7	A	A	I	B	C	B
Донник 19	SMED19	клубенек	8	G	nd	L	B	E	A
Донник 20	SMEL20	клубенек	9	F	B	K	B	A	A
Донник 21	SMEL21	клубенек	10	B	C	B	B	B	B

однородной культуры штаммов ризобияльных клеток проводили 2-кратные пересевы колоний (Румянцева и др., 2011). Для выделения клубеньковых бактерий из образцов почв использовалась методика инокулирования растений-хозяев почвенными суспензиями (болтушками) в стерильных микровегетационных опытах с последующим выделением ризобий из образовавшихся клубеньков (Young et al., 1987).

**Работа с ДНК.** Экстракцию бактериальной ДНК проводили по следующей методике. Ночную культуру ризобияльных клеток выращивали в жидкой среде TY (Behringer, 1974) при 28 °С. Через 24 часа клетки осаждали, затем добавляли лизирующий раствор (TRIS-HCl, pH 8,0, 25 mM, EDTA 10 mM, РНК-аза 0,2 мг/мл, лизоцим 1 мг/мл), инкубировали 5 мин при комнатной температуре, а затем добавляли 10 %-й (w/v) раствор SDS до конечной концентрации 1 % (w/v). Лизаты инкубировали при температуре 65 °С 30 мин, затем замораживали. После размораживания к лизатам добавляли 1/10 объема 3 M ацетата натрия. Далее проводили очистку ДНК от белковых примесей методом фенол-хлороформной экстракции, после которой ДНК осаждали этиловым спиртом.

Для определения таксономической принадлежности выделенных природных изолятов использовали метод рестрикционного анализа консервативного участка гена 16S рРНК. Бактериальную ДНК исследуемых штаммов амплифицировали с использованием праймеров FD1-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG и RD1-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA, далее полученные ДНК-фрагменты обрабатывали эндонуклеазой RsaI. Полученные рестрикционные типы (рис. 1) сравнивали с профилями фрагментов гена 16S РНК типовых штаммов CC169 (*S. medicae*) и Rm1021 (*S. meliloti*) (Румянцева и др., 2011).

С целью изучения генетического разнообразия клубеньковых бактерий был проведен RFLP-анализ по 6 локусам ризобияльного генома (IGS, *leu* — хромосома, *fixA*, *nifD*, *nodD* и *nodL-noeA* — плаزمида SymA) (табл. 1). Указанные фрагменты генома амплифицировали с использованием следующих праймеров IGS (FGPL-132 — CCGGGTTTCCCCATTCGG, FGPS1490-72 — TGCGGCTGGATCCCCTCCTT) (Laguerre et al., 1996), *leu* (*LeuB* new F — CACCAGCGAGAGGAAGAGAC, *LeuB* new-R1 — GAAACCCTGCGTTTGTGAT), *fixA* (*fixA* 390 F — 5' 'GTTGATAATGGTCGGCACG 3', *fixA* 390 R — 5' TGATGTCACAATCTCGCTCC 3'), *nifD* (390\_ *nifD* F — 5' ATTCGTTGAGCGATTTCTGA 3', 390\_ *nifD* R — 5' GTCTCCTGCTTGTCTTTGC 3'), *nodL-noeA* (*nodL-noeA* F — 5' TCCGTCCGCCCTTCACT 3', *nodL-noeA* R — 5' AAATCCGCACTCGGCACCC 3'), *nod* (PDA — GCAGCAACTCGAAGCTGAC, D1L — ATAGGTGCCGATGACGAAGA) (все праймеры, за исключением праймеров на IGS, были сконструированы

в настоящей работе). Полученные амплификаты обрабатывали двумя рестриктазами *HaeIII* и *MspI* (пример рестрикционных профилей приведен на рисунке 1 б). Фракционирование ДНК-фрагментов проводили по стандартной методике электрофореза в агарозном геле (Маниатис и др., 1984). Полученные гели документировали с использованием фотосистемы Kodak EDAS290.

**Статистический анализ.** Степень полиморфизма RFLP-типов в анализируемых субпопуляциях ризобий была рассчитана с использованием индекса разнообразия Шеннона (H). Для анализа достоверности различий между индексами разнообразия применяли метод bootstrap, реализованный в программе PAST (Hammer et al., 2001). Дифференциацию субпопуляций по частотам рестрикционных типов оценивали по индексу генетических расстояний Нея (D) (Nei, 1972). Для оценки неравновесия по сцеплению между анализируемыми локусами использовали пакет программ Arlequin 1.1 (Schneider et al., 1997).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Выделение изолятов и определение таксономической принадлежности

Созданная коллекция ризобий состояла из 42 изолятов. По происхождению эти изоляты можно было разделить на две субпопуляции — 20 «клубеньковых» изолятов, выделенных из клубеньков дикорастущих люцерны и донника (К-изоляты) и 22 «почвенных» изолята, выделенных из почвенных суспензий в условиях микровегетационного опыта с растениями люцерны и донника (П-изоляты). По признаку растения-хозяина ту же самую коллекцию ризобий можно было разделить на 21 изолят, выделенный из клубеньков люцерны хмелевидной как дикорастущей, так и в условиях микровегетационного опыта (Л-изоляты) и 21 изолят, выделенный из клубеньков донника белого, как дикорастущего, так и в условиях микровегетационного опыта (Д-изоляты) (табл. 1). В соответствии с критерием  $\chi^2$  оба деления (К/П-изоляты и Л/Д-изоляты) были независимы ( $P > 0,5$ ).

Для определения видовой принадлежности выделенных ризобияльных бактерий использовали экспресс-метод RFLP-анализа консервативного участка гена 16S рРНК. Полученные рестрикционные профили штаммов сравнивали с рестрикционными профилями типовых штаммов (рис. 2 а). Данные анализа фрагмента 16S рРНК показали, что из выделенных 42 штаммов 31 принадлежит к виду *Sinorhizobium meliloti*, а оставшиеся 11 — к виду *Sinorhizobium medicae*. Как показано в таблице 1, у клубеньковых изолятов, выделенных из-под растений люцерны 7 изолятов относятся к *S. meliloti* и 3 штамма к *S. medicae*. Среди почвенных изолятов наблюдается практически

ки равномерное распределение двух видов бактерий по сайтам сбора (6 изолятов *S. meliloti* и 5 изолятов *S. medicae*). Совсем иная картина наблюдается среди ризобий, выделенных из-под растений донников. Из 10 штаммов клубеньковых изолятов 8 принадлежат к *S. meliloti* и 2 к *S. medicae*; среди почвенных изолятов преобладает штамм *S. meliloti* (10 изолятов).

*Сравнение генетического полиморфизма в субпопуляциях*

Для последующего изучения генетического полиморфизма были отобраны изоляты, принадлежащие к виду *S. meliloti*, так как они составили большую часть анализируемой коллекции (31 изолят). Кроме того, сравнительный анализ генетического разнообразия в таксономически неоднородной выборке, содержащей изоляты двух различных видов, статистически некорректен.

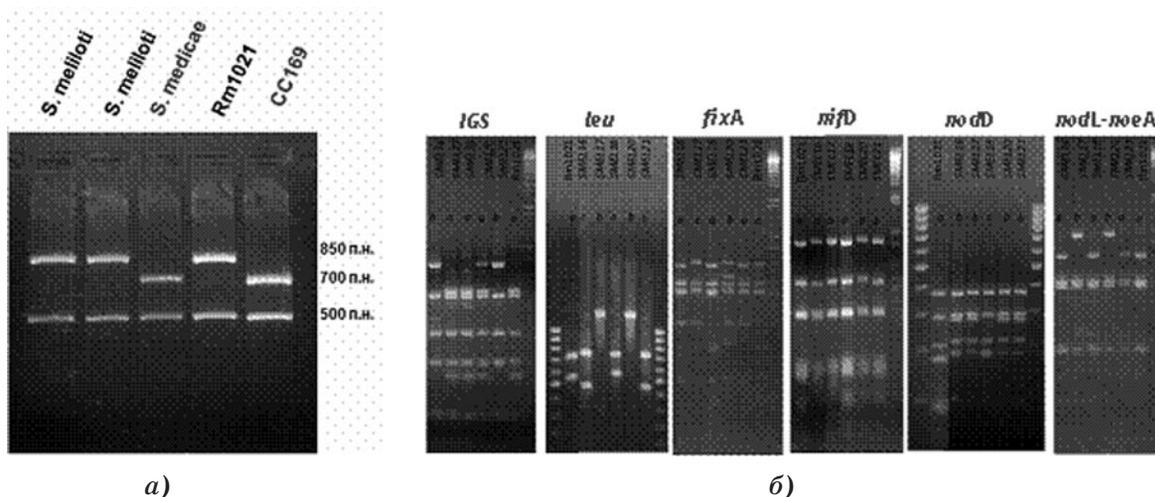
Проведенный сравнительный анализ полиморфизма основан на разделении совокупной выборки природных изолятов *S. meliloti* на субпопуляции по двум критериям — по растению хозяину (18 изолятов из клубеньков донника и 13 из клубеньков люцерны) и по происхождению (16 почвенных изолятов и 15 клубеньковых) (табл. 1). В соответствии с критерием  $\chi^2$  — эти два признака (растение-хозяин и происхождение), независимы ( $P > 0,5$ ), поэтому данные сопоставления статистически достоверны.

*Анализ уровней генетического разнообразия в субпопуляциях*

В ходе исследования провели анализ рестрикционного полиморфизма 2 хромосомных и 4 симбиотических участков генома, примеры рестрикционных профилей приведены на рисунке 2 б. Согласно литературным данным симбиотические участки ризобияльного генома более гетерогенны, чем хромосомные (Young et al., 1988; Wexler et al., 1996), при этом штаммы клубеньковых бактерий более генетически

разнообразны по сравнению с почвенными изолятами (Bromfield, 1995; Kosier, 1993; Young, 1987). В ходе анализа в совокупной популяции были выявлены следующие количества RFLP-типов по локусам: IGS — 6 типов, *leu* — 3 типа, *fixA* — 9 типов, *nifD* — 5 типов, *nodD* — 6 типов, *nodL-noeA* — 6 типов. И хотя, по всей видимости, разнообразие симбиотических локусов, выявленное в данной работе, несколько превосходит разнообразие хромосомных, их прямое сопоставление не вполне корректно, так как проанализированные участки различаются по длине.

В то же время вполне законным является сопоставление генетического разнообразия между субпопуляциями по отдельным локусам. На основании индекса разнообразия Шеннона (H) выявлены сходные уровни генетического разнообразия при сравнении субпопуляций донник-люцерна по всем изучаемым локусам бактериального генома, как по хромосомным, так и по симбиотическим. В то же время значения индексов разнообразия у клубеньковой субпопуляции по хромосомным локусам достоверно превышают данные у субпопуляции почвенных изолятов. По анализируемым симбиотическим районам значения разнообразия у изолятов клубеньковой и почвенной субпопуляций оказались одинаковыми. Большее разнообразие хромосомных локусов у клубеньковых изолятов является, скорее, неожиданным, так как можно было бы ожидать обратной картины (по причине большей вовлеченности хромосомных локусов в адаптацию к гетерогенным условиям почвенных ниш). Неожиданным также является сходство уровней разнообразия по симбиотическим локусам у почвенных и клубеньковых изолятов (теоретически можно было бы ожидать более высоких уровней разнообразия по симбиотическим локусам у клубеньковой популяции). Однако самым интересным будет сопоставление уровней разнообразия сопряженных ризобияльной и растительной популяций,



**Рис. 2.** Анализ полиморфизма рестрикционных профилей фрагмента гена 16S рРНК штаммов *S. meliloti* и *S. medicae* (а); примеры рестрикционных профилей по исследуемым участкам генома (б)

Таблица 2.

Сопоставление генетического разнообразия (Н) в субпопуляциях Л/Д и П/К и анализ дифференциации между ними (D). Приведены вероятности, характеризующие достоверность различий

Локус			IGS	<i>leu</i>	<i>fixA</i>	<i>nifD</i>	<i>nodD</i>	<i>nodL-noeA</i>
Донник-Люцерна	Разнообразие	Н (Л-изоляты)	0,93	1,01	1,52	0,93	1,51	1,21
		Н (Д-изоляты)	0,97	1,03	1,38	0,42	1,19	1,29
		P	0,82	0,76	0,78	0,19	0,24	0,82
	Дифференциация	Nei	0,96	0,85	0,9	0,97	0,92	0,95
		P (СНЭДЭКOP)	$p > 0,3$	$p > 0,25$	$p > 0,3$	$p > 0,25$	$p > 0,3$	$p > 0,3$
Клубенек-Почва	Разнообразие	Н (К-изоляты)	1,27	1,0	1,37	0,72	1,36	1,06
		Н (П-изоляты)	0,46	0,77	1,30	0,68	1,10	0,95
		P	0,02	0,02	0,9	0,94	0,42	0,72
	Дифференциация	Nei	0,30	0,68	0,22	0,01	0,05	0,43
		P (СНЭДЭКOP)	$p < 0,1$	$p < 0,01$	$p < 0,2$	$p < 0,9$	$p < 0,7$	$p < 0,1$

Таблица 3.

Анализ неравновесия по сцеплению между локусами в субпопуляциях *S. meliloti* Л, Д, П, К, и в совокупной популяции. (+) — пары локусов, в которых выявлено достоверное сцепление. Значения соответствующих вероятностей приведены под диагоналями

локус	IGS	<i>leu</i>	<i>fixA</i>	<i>nifD</i>	<i>nodD</i>	<i>nodL-noeA</i>	локус	IGS	<i>leu</i>	<i>fixA</i>	<i>nifD</i>	<i>nodD</i>	<i>nodL-noeA</i>
IGS		+	-	-	+	+	IGS		+	+	+	+	+
<i>leu</i>	0,00		-	-	-	+	<i>leu</i>	0,00		+	-	+	+
<i>fixA</i>	0,22	0,09		+	+	-	<i>fixA</i>	0,00	0,03		+	+	-
<i>nifD</i>	0,06	0,10	0,00		-	-	<i>nifD</i>	0,00	0,11	0,00		-	-
<i>nodD</i>	0,03	0,29	0,00	0,18		+	<i>nodD</i>	0,01	0,02	0,00	0,06		+
<i>nodL-noeA</i>	0,01	0,02	0,41	0,15	0,03	<b>Л</b>	<i>nodL-noeA</i>	0,03	0,01	0,15	0,06	0,03	<b>К</b>
локус	IGS	<i>leu</i>	<i>fixA</i>	<i>nifD</i>	<i>nodD</i>	<i>nodL-noeA</i>	локус	IGS	<i>leu</i>	<i>fixA</i>	<i>nifD</i>	<i>nodD</i>	<i>nodL-noeA</i>
IGS		+	-	-	-	-	IGS		+	-	-	-	-
<i>leu</i>	0,00		+	+	+	+	<i>leu</i>	0,0		-	+	+	+
<i>fixA</i>	0,24	0,00		-	+	-	<i>fixA</i>	1,00	0,1		+	+	-
<i>nifD</i>	0,64	0,00	0,09		+	+	<i>nifD</i>	100	0,01	0,01		-	-
<i>nodD</i>	0,77	0,00	0,00	0,00		+	<i>nodD</i>	0,7	0,01	0,00	0,08		+
<i>nodL-noeA</i>	0,09	0,02	0,14	0,04	0,02	<b>Д</b>	<i>nodL-noeA</i>	0,18	0,00	0,2	0,12	0,00	<b>П</b>
локус	IGS	<i>leu</i>	<i>fixA</i>	<i>nifD</i>	<i>nodD</i>	<i>nodL-noeA</i>	локус	IGS	<i>leu</i>	<i>fixA</i>	<i>nifD</i>	<i>nodD</i>	<i>nodL-noeA</i>
IGS		+	+	-	-	+	IGS		+	+	-	-	+
<i>leu</i>	0,00		+	+	+	+	<i>leu</i>	0,00		+	+	+	+
<i>fixA</i>	0,00	0,00		+	+	-	<i>fixA</i>	0,00	0,00		+	+	-
<i>nifD</i>	0,16	0,00	0,00		+	+	<i>nifD</i>	0,16	0,00	0,00		+	+
<i>nodD</i>	0,09	0,00	0,00	0,00		+	<i>nodD</i>	0,09	0,00	0,00	0,00		+
<i>nodL-noeA</i>	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	<b>Все</b>	<i>nodL-noeA</i>	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	<b>Все</b>

которое будет выполнено в одной из следующих публикаций. Данное сопоставление должно дать ответ на вопрос о связи генетического разнообразия популяции растения-хозяина с разнообразием выделенных из него ризобий.

#### *Генетическая дифференциация субпопуляций по частотам RFLP-типов*

Для сравнительной оценки распределения различных RFLP-типов среди изолятов в субпопуляциях (донник-люцерна, почва-клубенек) использовали индекс Нея (D-differentiation) (Nei, 1972), варьирующий от 0 (идентичность по частотам RFLP-типов) до 1 (полное различие по частотам RFLP-типов). Для анализа достоверности различий использовали метод Снэдекора (модифицированный критерий  $\chi^2$  для малых выборок). Индекс D, рассчитанный по 6 локусам (2 хромосомным и 4 симбиотическим), у субпопуляции донник-люцерна варьирует от 0,03 до 0,15 (табл. 2). Полученные значения D указывают на слабую дифференциацию по частотам RFLP-типов между субпопуляциями донник-люцерна. При этом значения генетической дифференциации у субпопуляции клубенек-почва варьируют от 0,01 до 0,68. Уровень генетических различий в этой субпопуляции существенно превышает значения D у субпопуляции донник-люцерна. Наибольшая степень дифференциации выявлена по локусам IGS и *leu* (хромосома), и *nodL-noeA* (симбиотическая плазмида) между клубеньковыми и почвенными изолятами (табл. 2) Таким образом, оценка степени генетических различий показала, что наибольшие различия по уровням генетического разнообразия и наибольшая степень генетической дифференциации наблюдается между изолятами субпопуляции клубенек-почва по хромосомным локусам.

Таким образом, из двух факторов — растения-хозяина (люцерна-донник) и происхождения (почва-клубенек) второй, несомненно, имеет более выраженное влияние на генетическое разнообразие изученной популяции *S. meliloti*. Данный факт является довольно неожиданным, так как целый ряд исследований свидетельствует о том, что именно растение-хозяин является наиболее мощным фактором, ответственным за формирование генетической структуры природных популяций ризобий (Андронов и др., 1999; Andronov et al., 2003). Наиболее интересным является сравнение результатов, полученных в настоящей работе и результатов, полученных одним из соавторов 10 лет назад (Андронов и др., 1999), при изучении ризобий, также выделенных из люцерны и донника недалеко от Иркутска. Именно в этой популяции была выявлена четкая дифференциация между субпопуляциями ризобий донника и люцерны по тому же самому локусу *nodD*, по которому в настоящем исследовании достоверной дифференциации не выявлено. Для объяснения данного феномена, необходимо отметить, что в раннем ис-

следовании была использована Саузерн-гибридизация с пробой на ген *nodD*. Выявленные гибридационные паттерны представляли собой довольно большие (до 20 тпн) фрагменты, разнообразие которых, очевидно, было вызвано интенсивными геномными перестройками, обычными для симбиотической мегаплазмиды ризобий люцерны (Андронов и др., 2001, Румянцева и др., 2004). В настоящем же исследовании был использован принципиально иной подход — рестрикционный анализ фрагментов амплификации, позволяющий детектировать полиморфизм, который связан не с геномными перестройками, а по большей части с точечными заменами нуклеотидов в результате мутационного процесса. Сопоставление данных, опубликованных в 1999 году и полученных в настоящей работе, позволяет сделать довольно неожиданный вывод: генетическая дифференциация между популяциями ризобий донника и люцерны, принадлежащих к одной и той же группе перекрестной инокуляции, скорее всего, существует, но обусловлена она особенностями генома, которые, скорее, являются следствием геномных перестроек, чем мутационного процесса.

#### *Анализ сцепления между локусами*

Для оценки генетической структуры популяции довольно широко используется мультилокусный анализ неравновесия по сцеплению. О неравновесии по сцеплению говорят, когда два или более аллелей в паре локусов встречаются вместе чаще, чем можно было бы ожидать из их частот. При этом сцепление свидетельствует об ограниченности горизонтального переноса генов в популяции.

В настоящей работе было проанализировано сцепление во всех возможных парах локусов, как в совокупной популяции, так и в каждой из рассматриваемых субпопуляций (табл. 3 а–д). Обращает на себя внимание весьма примечательный факт — рост числа сцепленных локусов при объединении субпопуляций. Так, в субпопуляциях Л и Д по 6 и 9 сцепленных пар локусов, соответственно, в то время как в совокупной популяции их 12. В субпопуляциях К и П 11 и 7 сцепленных пар локусов, соответственно и 12 в совокупной. Такое соотношение, скорее всего, является свидетельством того, что перенос генов между ризобиями осуществляется преимущественно внутри каждой из субпопуляций, но не между ними. Аналогичные рассуждения приводились в литературе ранее (Maupard Smith et al., 1993). С биологической точки зрения для наблюдаемого феномена есть вполне логичное объяснение: перенос генов осуществляется преимущественно в ризосфере растения-хозяина, что вполне логично, что и является причиной наблюдаемых соотношений. Подтверждением этому служит то, что рост числа сцепленных пар локусов наиболее выражен в субпопуляциях Л–Д по сравнению с субпопуляциями К–П.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе публикуется первая часть исследований сопряженной коллекции, представляющей растения-хозяева одной и той же перекрестной группы инокуляции (донник и люцерна). Это одна из первых работ, посвященных исследованию сопряженных коллекций. По причине обширности экспериментального материала его изложение будет выполнено в нескольких публикациях, одна из которых будет посвящена анализу растительного компонента и две — различным эффектам, выявленным при анализе феномена сопряженности, демонстрирующего особенности коэволюционных процессов в системах бобово-ризобиального симбиоза.

Работа поддержана Министерством науки и образования РФ (ГК № 16.552.11.7047) и грантом РФФИ 12-04-01768-а.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д., 1984. Молекулярное клонирование. М., Мир, 480 с.
2. Острроверхова Г.П., Острроверхова Н.В., 2007. Коадаптивная система «гриб-мицетофаг»: эколого-филогенетический аспект // Вестник Томского государственного университета. Биология. Т. 1. С. 31–40.
3. Проворов Н.А., 2001а. Генетико-эволюционные основы учения о симбиозе // Журн. общ. биологии. Т. 62. № 6. С. 472–495
4. Проворов Н.А., Симаров Б.В., 1984 б. Специфичность взаимодействия клубеньковых бактерий люцерны с разными видами растений-хозяев // С.-х. биология. Т. 19. № 7. С. 70–74.
5. Румянцева М.Л., Симаров Б.В., Онищук О.П. и др., 2011. Биологическое разнообразие клубеньковых бактерий в экосистемах и агроценозах. Теоретические основы и методы / под ред. Румянцевой М.Л. и Симарова Б.В. СПб: Инновационный центр защиты растений. 104 с.
1. Тихонович И.А., Проворов Н.А., 2009. Симбиоз растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агроэcosystem будущего. СПб: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 210 с.
2. Andronov E.E., Roumiantseva M.L., Onichtchouk O.P. et al., 2003. Symbiotic and genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolates collected from the *Galega orientalis* gene center in the Caucasus // Appl. & Env. Microbiol. Vol. 69. № 2. P. 1067.
3. Andronov E.E., Roumyantseva M.L., Sagoulenko V.V. et al., 1999. Effect of the host plant on the genetic diversity of a natural population of *Sinorhizobium meliloti* // Rus. J. of Genetics. Vol. 35. № 10. P. 1358–1366.
3. Andronov E.E., Roumiantseva M.L., Simarov B.V., 2001. Genetic diversity of a natural population of *Sinorhizobium meliloti* revealed in analysis of cryptic plasmids and ISRM2011–2 fingerprints // Rus. J. of Genetics. Vol. 37. № 5. P. 494–499.
4. Behringer, J.E., 1974. R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum* // J. Gen. Microbiol. Vol. 84. P. 188–198.
5. Bromfield E. S.P., Barran L.R., Wheatcroft R., 1995. Relative genetic structure of a population of *Rhizobium meliloti* isolated directly from soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) and sweet clover (*Melilotus alba*) // Molecular Ecology. Vol. 4. № 2. P. 183–188.
6. Hammer, O., Harper, D.A. T., Ryan P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis // Palaeontologia Electronica. Vol. 4. № 1. P. 9. URL: [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)
7. Kosier B., Puhler A., Simon R., 1993. Monitoring the diversity of *Rhizobium meliloti* field and microcosm isolates with a novel rapid genotyping method using insertion elements // Molec. Ecol. Vol. 12. P. 35–46.
8. Laguerre G., Mavingui P., Allard M. et al., 1996. 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. & Env. Microbiol. Vol. 62. № 6. P. 2029–2036.
9. Maynard Smith J.M., Smith N.H., O'Rourke M. et al., 1993. How clonal are bacteria? // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 90. № 10. P. 4384–4388.
10. Nei M., 1972. Genetic distance between populations // Am. Nat. Vol. 106. P. 283–292.
11. Roumiantseva M.L., Andronov E.E., Sagoulenko V.V. et al., 2004. Instability of cryptic plasmids in strain *Sinorhizobium meliloti* P108 in the course of symbiosis with alfalfa *Medicago sativa* // Rus. J. of Genetics. Vol. 40. № 4. P. 356–362.
12. Schneider S., Rossie D., Excoffier L., 1997. Arlequin ver 2.000: A software for population genetics data analysis // Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva.
13. Wexler M., Gordon, D.M. & Murphy, P.J., 1996. Genetic relationships among rhizopine-producing *Rhizobium* strains // Microbiology. Vol. 142. P. 1059–1066.
14. Young J.P.V., Demetriou L., Apte R.G. 1987. *Rhizobium* population genetics: enzyme polymorphism in *Rhizobium leguminosarum* from plants and soil in a Pea Crop. Appl. Environ. Microb. Vol. 53. P. 397–402.

LINKED SYMBIOTIC POPULATIONS: ANALYSIS  
OF GENETIC DIVERSITY OF RHIZOBIAL COMPONENT

Muntyan A. N., Belova V. S., Roumiantseva M. L.,  
Simarov B. V., Andronov E. E

✿ **SUMMARY:** Understanding the selective constraints of partner specificity in mutually beneficial symbiosis is a significant, yet largely unexplored, prospect of evolutionary biology. These selective constraints can be explored through the study of nucleotide polymorphism at loci controlling specificity. We used a model legume-rhizobium mutualism to test for evidence that context-dependent selection may maintain variation in partner quality. We analyze the taxonomic structure, the heterogeneity and linkage disequilibrium of the rhizobial population between symbiotic (*nif*-, *fix*- and *nod*-, *nodL*-*noeA* genes) and chromosomal (*leu*- and IGS loci) genetic markers.

✿ **KEY WORDS:** conjugate collections; nodule bacteria population; genetic polymorphism; *Sinorhizobium meliloti*.

## ✿ Информация об авторах

**Мунтян Алексей Николаевич** — м. н. с., лаборатория № 6.  
E-mail: mirtrudmay@yandex.ru.

**Андронов Евгений Евгеньевич** — зав. лабораторией, к. б. н., лаборатория № 8.  
E-mail: eeandr@gmail.ru.

**Белова Виктория Спартаковна** — м. н. с., лаборатория № 6.  
E-mail: genet@yandex.ru.

**Румянцева Марина Львовна** — вед. н. с., лаборатория № 6.  
E-mail: genet@yandex.ru.

**Симаров Борис Васильевич** — зав. лабораторией, д. б. н., профессор, лаборатория № 6.  
E-mail: genet@yandex.ru.

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии. 196608, СПб, Пушкин, ш. Подбельского, д. 3.

**Muntyan Alexey Nikolaevich** — Junior Researcher, Lab № 6.  
E-mail: mirtrudmay@yandex.ru.

**Andronov Evgeny Evgenievich** — Head of the Laboratory, Candidate of Biological Sciences, Lab № 8.  
E-mail: eeandr@gmail.ru.

**Belova Victoria Spartakovna** — Junior Researcher, Lab № 6.  
E-mail: genet@yandex.ru.

**Roumiantseva Marina Lvovna** — Senior Research Fellow, Candidate of Biological Sciences, Lab № 6.  
E-mail: genet@yandex.ru.

**Simarov Boris Vasilievich** — Head of the Laboratory, Doctor of Biological Sciences, Professor, Lab № 6.  
E-mail: genet@yandex.ru.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology.  
Podbelsky chausse 3, Saint-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia.