

© В. С. Зотов<sup>1</sup>, Н. В. Пунина<sup>1,2</sup>,  
С. А. Хапчаева<sup>1</sup>, С. В. Дидович<sup>3</sup>,  
Т. Н. Мельничук<sup>3</sup>,  
А. Ф. Топунов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ науки Институт биохимии им. А. Н. Баха Российской академии наук, Москва, Россия; <sup>2</sup> ФГБУ Медико-генетический научный центр Российской академии медицинских наук, Москва, Россия; <sup>3</sup> Институт сельского хозяйства Крыма НААН Украины, Симферополь, АР Крым

✿ Предложен новый таксономический маркер (*hin*-регион), позволяющий изучать разнообразие представителей рода *Rhizobium* на уровне вида — группы штаммов. С его помощью были выделены группы штаммов *Rhizobium*, которые невозможно было детектировать другими методами, что коррелировало с эволюционной близостью бактерий. Разработанный подход к созданию маркерных систем позволяет эффективно описывать внутри- и межвидовое генетическое разнообразие клубеньковых бактерий и давать их оценку на перспективность использования в сельскохозяйственной практике. С помощью предложенной маркерной системы описаны изоляты бактерий рода *Rhizobium*, выделенные из различных эколого-географических зон Украины.

✿ **Ключевые слова:** *Rhizobium*; филогения; таксономия; детекция; разнообразие; saAFLP; *hin*-регион ПЦР; ПЦР-RFLP; 16S рибосомальная РНК; 16S-23S рибосомальная РНК

Поступила в редакцию 29.11.2011  
Принята к публикации 05.06.2012

## НОВЫЙ ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ МАРКЕР КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *RHIZOBIUM* И ЕГО ЭВОЛЮЦИЯ

Известно, что клубеньковые бактерии разделяют на две большие группы — быстро- и медленно растущие, отличающиеся по скорости роста, характеру метаболизма углеводов и азотистых соединений (*Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями, 2002), специфичности взаимодействия с различными бобовыми культурами (широко- и узкоспецифичные) (Martínez-Romero, Caballero-Mellado, 1996).

В настоящее время, как правило, таксономию и эволюционные взаимоотношения порядка *Rhizobiales* изучают с помощью сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Однако такая оценка не всегда соответствует данным, полученным по другим локусам (Gaunt et al., 2001). Вследствие частых межвидовых рекомбинаций между различными аллелями таксономически важных генов (таких как 16S рРНК, *dnkA*, *nod*), не всегда удается адекватно классифицировать изоляты ризобий, что приводит к необходимости получения дополнительных генетических данных (Suominen et al., 2001; Eardly et al., 2005; Vinuesa et al., 2008). Особый интерес в качестве модельного объекта данного порядка представляет род *Rhizobium* (Frank, 1889), имеющий сложную таксономическую структуру, которую сложно изучать существующими в настоящее время методами.

Целью исследований являлась разработка специфических для клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* генетических маркерных систем, позволяющих изучать их на уровне вида — группы штаммов.

С целью создания быстрого, дешевого и достоверного способа детекции и изучения биоразнообразия популяционной структуры клубеньковых бактерий нами были предложены методы: saAFLP (Zotov et al., 2010) и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей *hin*-региона (Зотов с соавт., 2011).

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Бактериальные штаммы.** В работе были использованы 52 изолята клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* из коллекций полезных микроорганизмов различных научных учреждений Украины и России: Института сельского хозяйства Крыма Национальной академии аграрных наук Украины (ИСХК НААН), г. Симферополь; Института сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства Национальной академии аграрных наук, г. Чернигов; института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного Национальной академии наук Украины, г. Киев; Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук, ВНИИСХМ РАСХН, г. Санкт-Петербург. 9 штаммов из коллекции ВНИИСХМ РАСХН использовались в качестве типовых. Изоляты коллекции отдела микробиологии ИСХК НААН были выделены в разных эколого-географических зонах Украины: степи, лесостепи и Полесья (табл. 1).

**Идентификация.** Культуральные и физиолого-биохимические свойства изолятов *Rhizobium* sp. изучали согласно общепринятым методам микробиологии и биохимии (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991; Берджи, 1997) и методическим рекомендациям ВНИИСХМ РАСХН (Возняковская, Попова, 1985).

Таблица 1

Исследуемые штаммы ризобий и их группировка с использованием различных молекулярных методов

Штамм	Род/Вид	Сходство по 16S рРНК, %	Растение-хозяин (источник)	Географическое происхождение *	ITS ПЦР-RFLP генотип **	Группа saAFLP	hin-регион (класс/генотип)	Длина hin-региона, п.о.
У-1	<i>R. leguminosarum</i>	100	горох	Украина (ВО)	6	IA.1	I/A	270 + 410
28		100	горох	Украина (ЛО)	1	IA.1	I/A	270 + 410
П-2		100	горох	Украина (АРК)	1	IA.1	I/A	270 + 410
Ч-14		100	горох	Украина (ЛО)	1	IA.1	I/A	270 + 410
К-29		100	горох	Украина (ЛО)	2	IA.1	I/A	270 + 410
34		100	горох	Украина (АРК)	1	IA.5	I/A	270 + 410
65		100	горох	Украина (ОО)	1	IA.6	I/A	270 + 410
У-2		100	горох	Украина (ВО)	1	IA.7	I/A	270 + 410
У-4		100	горох	Украина (ВО)	1	IA.3	I/A	270 + 410
У-5		100	горох	Украина (ВО)	1	IA.3	I/A	270 + 410
32		100	горох	Украина (ЛО)	1	IA.3	I/A	270 + 410
32-2		100	горох	Украина (ЛО)	1	IA.3	I/A	270 + 410
682		100	фасоль	Украина	1	IA.8.1	I/A	270 + 410
31		99,93	горох	Украина (ЛО)	2	IA.4	I/A	270 + 410
2616 <sup>st</sup>		100	горох	Украина	3	IA.2	I/A	270 + 410
Г-8		100	горох	Украина (ХО)	1	IA.2	I/A	270 + 410
24		100	горох	Украина (ЛО)	1	IA.2	I/A	270 + 410
У-3		100	горох	Украина (ВО)	1	IA.2	I/A	270 + 410
У-11		100	горох	Украина (ВО)	1	IA.2	I/A	270 + 410
У-12		100	горох	Украина (ВО)	1	IA.2	I/A	270 + 410
ФА-4	100	фасоль	Украина (ХО)	1	IA.8.2	I/A	270 + 410	
Ф-1	100	фасоль	Украина (ХО)	1	IA.9	I/A	270 + 410	
ФА-34	100	фасоль	Украина (ХО)	1	IA.8.3	I/A	270 + 410	
1326 <sup>st</sup>	99,93	клевер	Россия (ЛО)	13	IA.10	I/A	270 + 410	
245a <sup>st</sup>	100	горох	Россия (МО)	4	IB.1	I/B	320 + 470	
248b	100	горох	Украина	3	IB.2	I/B	320 + 470	
У-9	100	горох	Украина (ВО)	3	IB.2	I/B	320 + 470	
У-7	100	горох	Украина (ВО)	5	IB.3	I/B	320 + 470	
96 <sup>st</sup>	100	бобы	Литва	7	IB.1	I/B	320 + 470	
97 <sup>st</sup>	100	бобы	Латвия	8	IB.2	I/B	320 + 470	
Б-6	100	бобы	Украина (ВО)	9	IB.2	I/B	320 + 470	

Таблица 1 (окончание)

Штамм	Род/Вид	Сходство по 16S рРНК, %	Растение-хозяин (источник)	Географическое происхождение*	ITS ПЦР-RFLP генотип**	Группа saAFLP	hsp-регион (класс/генотип)	Длина hsp-региона, п.о.
Б-8	<i>R. leguminosarum</i>	100	бобы	Украина (ВО)	9	IV.2	I/V	320 + 470
Б-17		100	бобы	Украина (ВО)	9	IV.2	I/V	320 + 470
Б-18		100	бобы	Украина (ВО)	9	IV.2	I/V	320 + 470
Б-9		100	бобы	Украина (ВО)	10	IV.3	I/V	320 + 470
Б-15		100	бобы	Украина (ВО)	10	IV.3	I/V	320 + 470
Б-16		100	бобы	Украина (ВО)	10	IV.3	I/V	320 + 470
Б-25		100	бобы	Украина (ВО)	10	IV.3	I/V	320 + 470
КП15		100	клевер	Украина (АРК)	11	IV.3.2	I/V	320 + 470
МК		100	клевер	Украина (АРК)	12	IV.2	I/V	320 + 470
КК		100	клевер	Украина (АРК)	12	IV.2	I/V	320 + 470
КП011		100	клевер	Украина (АРК)	13	IV.3.1	I/V	320 + 470
КП012		100	клевер	Украина (АРК)	13	IV.3.1	I/V	320 + 470
КЛ-90		100	клевер	Украина (АРК)	14	IV.3.3	I/V	320 + 470
КЛ-91		100	клевер	Украина (АРК)	14	IV.3.1	I/V	320 + 470
ФК-0		100	фасоль	Украина (ХО)	15	I b.1.1	I/b	320
ФК-4		100	фасоль	Украина (ХО)	15	I b.1.2	I/b	320
ФК-6		100	фасоль	Украина (ХО)	15	I b.1.3	I/b	320
108*		100	фасоль	Украина (ХО)	15	I b.1.4	I/b	320
105	100	фасоль	Армения	16	II.1.1	II/C	470 + 655	
108**	100	фасоль	Украина (ХО)	16	II.1.2	II/C	470 + 655	
ФН	100	фасоль	Украина (ХО)	16	II.1.3	II/C	470 + 655	
ФН-6	99,09	фасоль	Украина (ХО)	17	III.1	III/D	250	
ФС	99,72	фасоль	Украина (ХО)	18	IV.1	IV/E	260	
700 <sup>st</sup>	<i>R. etli</i>	99,93	фасоль	Мексика	19	V.1	V/F	370 + 520
912 <sup>st</sup>		99,86	козлятник	Россия (ЛО)	20	VI.1	VI/G	230
913 <sup>st</sup>	<i>R. galegae</i>	99,86	козлятник	Эстония	20	VI.1	VI/G	230
916 <sup>st</sup>		99,86	козлятник	Россия (ЛО)	20	VI.1	VI/G	230
926 <sup>st</sup>		99,86	козлятник	Украина	20	VI.1	VI/G	230
К-3		99,86	козлятник	Украина	20	VI.1	VI/G	230
К-18		99,86	козлятник	Украина	20	VI.1	VI/G	230
		99,86	козлятник	Украина	20	VI.1	VI/G	230

\* — Винницкая обл. (ВО); Одесская обл. (ОО); АР Крым (АРК); Московская обл. (МО); Ленинградская обл. (ЛО); Луганская обл. (ЛЮ); Харьковская область (ХО).

\*\* — Генотипы по совокупности данных RFLP с использованием эндонуклеаз рестрикции *AatI*, *MspI* и *HaeIII*

**Выделение ДНК.** Для выделения препаратов суммарной клеточной ДНК штаммы культивировали на агаризованной среде ТУ: дрожжевой экстракт — 1 г/л; пептон — 10 г/л; CaCl<sub>2</sub>—0,4 г/л; агар — 20 г/л (Beringer, 1974). ДНК была выделена из свежих культур на 1–2 сутки их роста с помощью метода сорбции на магнитных частицах (набор «Минипреп», «Силекс», Россия).

**Single adapter AFLP анализ (saAFLP) (Zotov et al., 2010).** Рестрикционный анализ проводили одновременно с лигированием в 10 мкл смеси, содержащей 80 нг образца ДНК, 1х лигазный буфер («Fermentas», США), 10 пкМ одноцепочечного адаптера (Ad.STAG1: 5'-ctagCTGGAATCGATTCCAG-3'), 5 ед. T4 ДНК лигазы («Fermentas», США) и 1 ед. рестриктазы XmaI (XbaI). Полученную смесь инкубировали при 37 °С в течение 2 часов, после чего доводили реакционный объем до 100 мкл. ПЦР проводили на амплификаторе Mastercycler gradient Eppendorf в 25 мкл смеси, содержащей 1х буфер для ПЦР, 2,8 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ dNTP, в качестве ДНК-матрицы — 2 мкл рестриционно-лигазной смеси, 0,4 мкМ праймера (Pr.STAG1: 5'-CTGGAATCGATTCCAGctag-3'), комплементарного адаптеру и 1 ед. ДНК-полимеразы BioTaq («Диалат ЛТД», Россия). Для ПЦР амплификации был использован следующий температурно-временной профиль: первоначальная денатурация при 94 °С — 2 мин; последующие 30 циклов: 94 °С — 30 с, 40 °С — 30 с, 72 °С — 3 мин; окончательная элонгация — 5 мин при 72 °С.

**ПЦР-амплификация гена 16S рРНК и *hin*-региона.** ПЦР анализ и последующее секвенирование (Sanger et al., 1977) нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК проводили с использованием праймеров FD1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' и RD1: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3' (Weisburg et al., 1991). Амплификацию *hin*-региона проводили с использованием разработанных нами специфических для рода *Rhizobium* праймеров и следующего протокола: первоначальная денатурация при 94 °С — 2 мин; последующие 30 циклов: 94 °С — 30 сек, 55 °С — 30 сек, 72 °С — 1 мин; окончательная элонгация 5 мин при 72 °С. Амплифицированные фрагменты детектировались при помощи электрофореза в 1,5% агарозном геле. Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3130xl («Applied Biosystems», США).

**Restriction fragment length polymorphism анализ (RFLP).** Амплификацию межгенного региона рибосомального кластера (ITS) для последующего рестриктового анализа проводили с использованием праймеров FGPS1490–72: 5'-TGCGGCTGGATCCCCTCCTT-3' (Normand et al., 1992) и ITS\_R: 5'-CGCAGCGTATCASCCTCCTT-3', адаптированных для бактерий рода *Rhizobium*. Рестрикционный анализ проводился с ис-

пользованием эндонуклеаз рестрикции *AluI*, *HaeIII* и *MspI* («Fermentas», США) согласно инструкциям производителя. Обработанную рестриктазами ДНК анализировали при помощи электрофореза в 4,0% агарозном геле.

**Анализ нуклеотидных последовательностей.** Первичный сравнительный анализ полученных последовательностей с последовательностями базы данных Ген-Банка был проведен с помощью программы NCBI Blast (Altschul et al., 1990). Выравнивание последовательностей проводили с помощью программы CLUSTALW 1.75v. (Thompson et al., 1994). Проверка и редактирование были осуществлены с помощью редактора «BioEdit 7.0.5.3» (Hall, 1999). Филогенетические деревья были построены в программе Mega 3.1 (Kumar et al., 2004) с помощью алгоритма Neighbor-Joining NJ (Nei and Kumar, 2000). Попарные генетические расстояния между последовательностями были определены по двухпараметрической модели Кимуры (Kimura, 1980). Уровень нуклеотидного полиморфизма вычислен в программе DnaSP 5.10 (Rozas et al., 2010).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Физиолого-биохимические свойства бактерий рода *Rhizobium*

Род *Rhizobium* традиционно классифицируют на основании фенотипических характеристик, таких как способность к образованию клубеньков и физиолого-биохимические свойства. По результатам проведенных анализов все изученные изоляты принадлежали роду *Rhizobium* и обладали специфичностью к инфицированию группы растений гороха, бобов, чины, вики, чечевицы (*bv. viciae*), а также растений фасоли (*bv. phaseoli*), клевера (*bv. trifolii*) и козлятника (*R. galegae*).

Изоляты клубеньковых бактерий коллекции отдела микробиологии ИСХК НААН показали высокую эффективность в симбиозе с современными сортами бобовых культур в почвенно-климатических условиях Украины. Это позволило повысить продуктивность растений на 10–30%, увеличить содержание белка в зерне на 2–6%, а в зеленой массе — на 1–3% даже при наличии в почве популяции аборигенных или ранее интродуцированных ризобий *Rhizobium* sp. (Дидович, 2008).

### Генетическое разнообразие бактерий рода *Rhizobium*

#### Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК

Полные ДНК-последовательности гена 16S рРНК (1445 п. о. по геному *R. leguminosarum* *bv. viciae* 3841) были получены для всех исследуемых изолятов и штаммов *Rhizobium* sp. Для каждого вида клубеньковых бактерий родов *Rhizobium*, *Sinorhizobium* и *Mesorhizobium*

в базе данных NCBI были найдены последовательности гена *16S* рРНК типовых штаммов (Kwon et al., 2005), которые также были взяты для анализа. В качестве удаленного контроля была использована ДНК-последовательность *16S* рРНК типового штамма *Bradyrhizobium japonicum* DSM30131<sup>T</sup> и построено филогенетическое дерево (рис. 1).

По результатам анализа все исследуемые изоляты были достоверно отнесены к 4 видам рода *Rhizobium*: *R. leguminosarum* (Frank, 1889), *R. etli* (Segovia et al., 1993), *R. giardinii* (Amarger et al., 1997) и *R. galegae* (Lindström, 1989) (табл. 1). Нуклеотидные последовательности вида *R. leguminosarum* имели одну внутривидовую замену G/A/C/T (1069 п. о. от начала гена по геному NC\_008380). У штаммов *R. giardinii*, *R. galegae* и *R. etli* внутривидовой полиморфизм ДНК-последовательностей гена *16S* рРНК обнаружен не был.

Однако, вследствие низкой разрешающей способности, частым рекомбинационным событиями и горизонтальному переносу, ген *16S* рРНК не может быть применён для достоверного определения филогенетической структуры рода *Rhizobium* на видовом уровне (Willems, Collins, 1993; Gaunt et al., 2001; Eardly et al., 2005). По результатам построения филогенетического дерева видна полифилетичная природа ризобий, что было показано и ранее (Martinez, 1994; Новикова, 1996).

#### RFLP-анализ межгенного региона *16S-23S* рРНК (ITS)

Нами был проведен анализ ITS бактерий рода *Rhizobium*, который показал, что 22 из 61 штамма имеют 2 продукта ПЦП-амплификации, отличных не только по длине, но и по нуклеотидному составу (Laguette et al., 1996; Palmer, Young, 2000; Vessey, Chemining'wa, 2006). С помощью рестрикции полученных продуктов ITS-ПЦП на внутривидовом уровне были достоверно выделены 20 ITS-RFLP генотипов (табл. 1). Также было проведено определение нуклеотидных последовательностей ITS 20 штаммов *Rhizobium* sp. (по одному штамму каждого ITS-RFLP генотипа), и в совокупности с нуклеотидными последовательностями референсных штаммов из ГенБанка (Kwon et al., 2005) было построено филогенетическое дерево (рис. 2). Высокий уровень нуклеотидной изменчивости ДНК-последовательности ITS-региона позволяет различать близкородственные штаммы, однако многокопийность ITS-регионов затрудняет интерпретацию филогенетических связей (Gürtler and Stanisich, 1996). Так, по данным сравнительного анализа полных нуклеотидных последовательностей ITS-региона штаммы 105 и FA-4 (симбионты фасоли) с единичными продуктами ITS-ПЦП относились к виду *R. etli*. К этому же виду относились и штаммы КК, КР012 и КЛ91 (симбионты клевера). В то же время по ДНК-последовательностям гена *16S* рРНК все эти

штаммы принадлежали к виду *R. leguminosarum*. Интересно, что геномы симбионтов клевера КК, КР012 и КЛ91 несут в своем составе 2 типа ITS-региона, при этом один принадлежит к виду *R. leguminosarum* (its-L — продукт ITS-ПЦП высокой молекулярной массы), другой — к *R. etli* (its-S — ITS-ПЦП продукт более низкой молекулярной массы). Вероятно, это указывает на горизонтальный перенос или частые рекомбинационные события, происходящие между ДНК-последовательностями различных видов бактерий данного рода (Terefework et al., 1998).

#### saAFLP анализ

Для достоверного анализа внутривидового полиморфизма штаммов рода *Rhizobium* был использован saAFLP с применением эндонуклеазы рестрикции — *Xma*JI (Zotov et al., 2010).

По данным saAFLP 23, штамма *R. leguminosarum* bv. *viceae*, инокулирующие горох, были достоверно разделены на два генотипа, относящиеся к генетически разнородным группам А и В (рис. 3, а), имеющим меньше 15% общих фрагментов. С помощью данного анализа удалось установить генетическую неоднородность штаммов *R. leguminosarum* из Винницкой и Херсонской областей Украины (рис. 3, а, табл. 1). Таким образом, внутри однородной по последовательности гена *16S* рРНК группы штаммов был показан значительный полиморфизм продуктов saAFLP и выявлено 4 генетические группы клубеньковых бактерий. Вероятно, данная вариабельность связана с определенными генетическими изменениями в процессе адаптации к различным эколого-географическим зонам и/или растениям-хозяевам (Terefework et al., 2001).

Шесть изолятов, симбионтов козлятника, отнесенных с помощью анализа нуклеотидных последовательностей гена *16S* рРНК к *R. galegae*, представляли собой генетически однородную группу штаммов с единым характерным для нее профилем saAFLP. Штаммы, отнесенные по анализу ДНК-последовательности *16S* рРНК к видам *R. etli* и *R. giardinii*, также имели свои уникальные saAFLP-профили.

Как известно, метод saAFLP является удобным инструментом для выбора таксонспецифичных маркеров. Одним из таких маркеров, найденных и изученных в данной работе, стал *hin*-регион (от латинского *hin* — уникальный, неповторимый) (Зотов с соавт., 2011. Заявка на патент рег. № 2011135461 от 25.08.2011). Маркер был обнаружен экспериментально при saAFLP-анализе штаммов *R. leguminosarum* bv. *viceae* (рис. 3).

#### Анализ *hin*-региона

В данной работе были амплифицированы и секвенированы полные нуклеотидные последовательности *hin*-региона (Zotov et al., 2010) 61 штамма бактерий рода



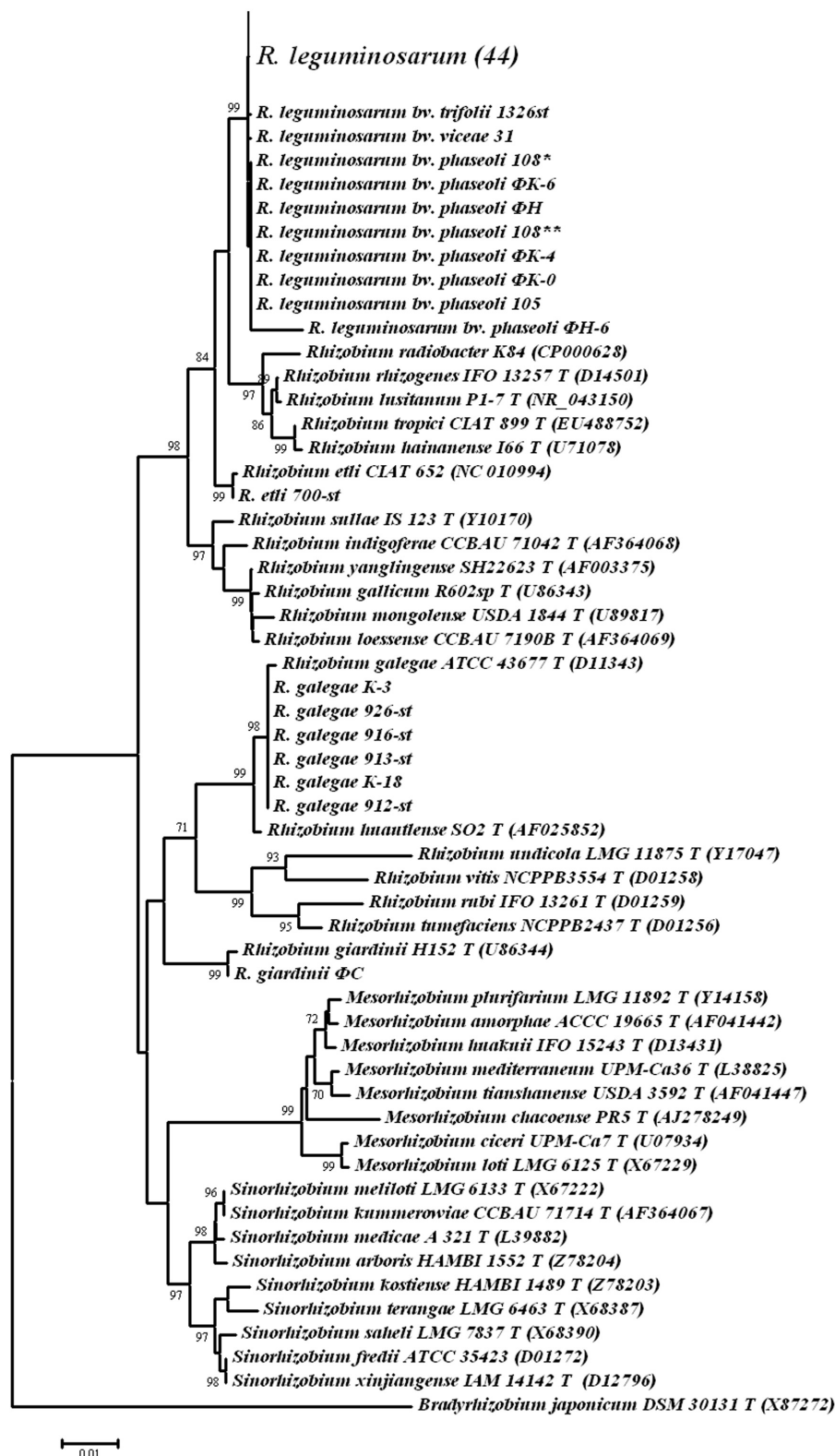


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе данных сравнительного анализа полных нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК бактерий рода *Rhizobium* с другими представителями Rhizobiaceae с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 1 замене на 100 пар оснований (генетическая дистанция). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (%), определенная с помощью «bootstrap»-анализа 1000 реплик. Значения «bootstrap» ниже 70% не показаны. Исследуемые штаммы относятся к роду, имеющему сокращение «R.»

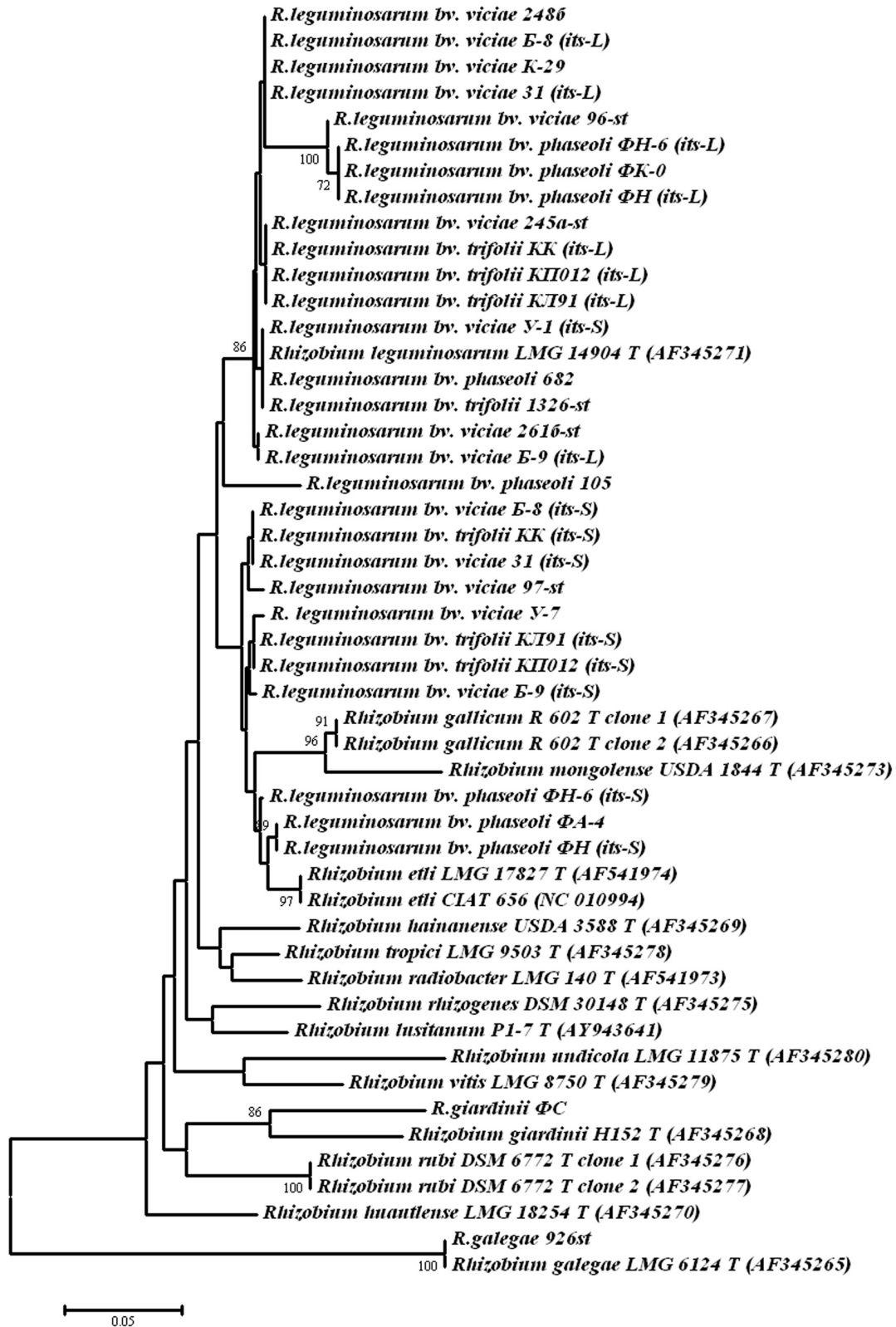
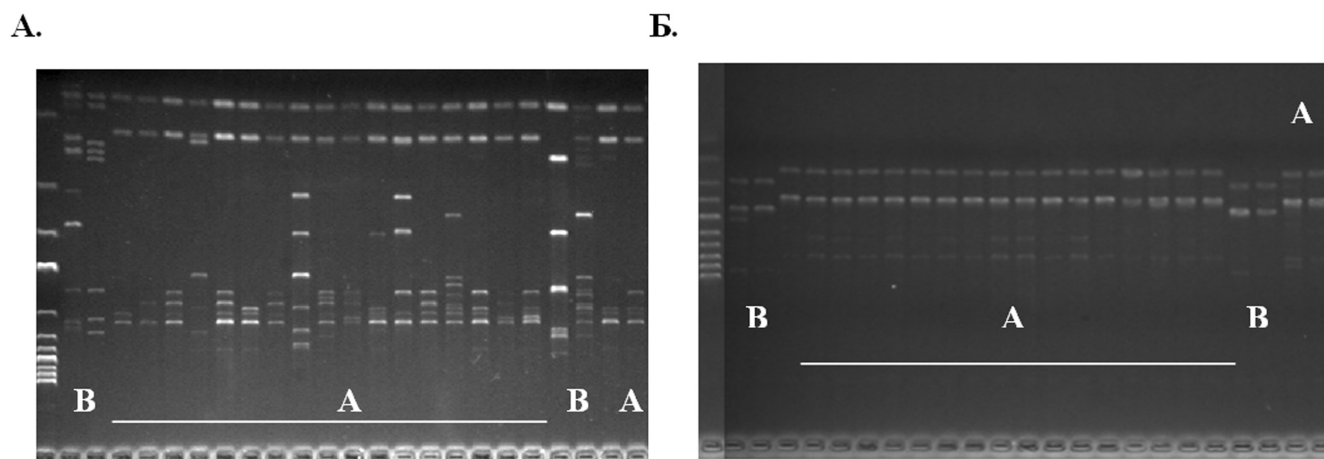
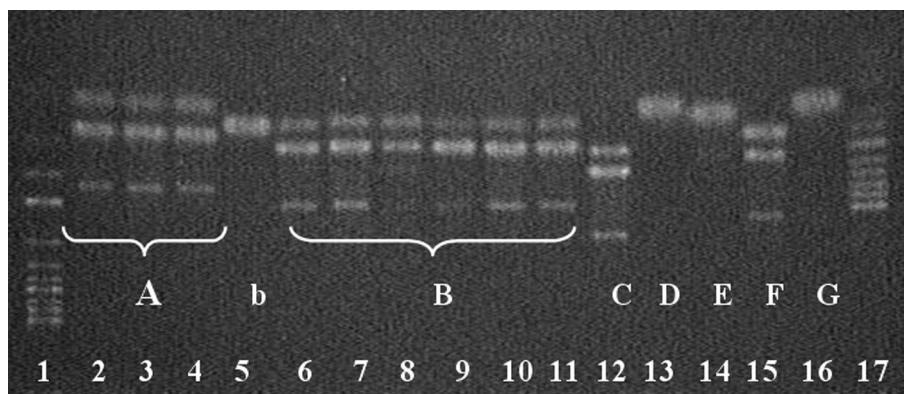


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе данных сравнительного анализа полных нуклеотидных последовательностей ITS бактерий рода *Rhizobium* с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 5 заменам на 100 пар оснований. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (%), определенная с помощью «bootstrap»-анализа 1000 реплик. Значения «bootstrap» ниже 70% не показаны. Исследуемые штаммы относятся к роду, имеющему сокращение «*R.*»



**Рис. 3.** А. saAFLP-анализ с использованием эндонуклеазы рестрикции *Xma*I для бактерий рода *R. leguminosarum*. Буквами А и В на рисунке обозначены генотипы *R. leguminosarum* по *hin*-региону (I класс);  
 Б. Амплификация *hin*-региона исследуемых штаммов *R. leguminosarum* с использованием специфичных для бактерий рода *Rhizobium* праймеров. Буквами А и В на рисунке обозначены генотипы *R. leguminosarum* по *hin*-региону (I класс)  
 Дорожки: 1 — маркер молекулярной массы 1 kb, 2 — штамм 245 а, 3 — 248 б, 4 — 261 б, 5 — К-29, 6 — П-2, 7 — Г-8, 8 — Ч-14, 9 — 24, 10 — 28, 11 — 31, 12 — 32, 13 — 32-2, 14 — 34, 15 — 65, 16 — У-1, 17 — У-2, 18 — У-3, 19 — У-4, 20 — У-5, 21 — У-7, 22 — У-9, 23 — У-11, 24 — У-12



**Рис. 4.** Амплификация *hin*-региона с использованием специфичных для бактерий рода *Rhizobium* праймеров. Буквами на рисунке обозначены генотипы бактерий рода *Rhizobium* по *hin*-региону (табл. 1).  
 Дорожки: 1 — маркер молекулярной массы 100–1000 п. о.,  
 2 — *R. leguminosarum* 28, 3 — *R. leguminosarum* К-29,  
 4 — *R. leguminosarum* 261 б, 5 — *R. leguminosarum* ФК-0,  
 6 — *R. leguminosarum* 96<sup>st</sup>, 7 — *R. leguminosarum* 245а,  
 8 — *R. leguminosarum* У-9, 9 — *R. leguminosarum* КП15,  
 10 — *R. leguminosarum* У-7, 11 — *R. leguminosarum* МК,  
 12 — *R. leguminosarum* ФН, 13 — *R. leguminosarum* ФН-6,  
 14 — *R. giardinii* ФС, 15 — *R. etli* 700<sup>st</sup>, 16 — *R. galegae* К-3,  
 17 — маркер молекулярной массы 100 п. о.

*Rhizobium* (табл. 1). Полученные последовательности были выровнены с помощью программы CLUSTALW (Thompson et al., 1994) и сравнены с 5 нуклеотидными последовательностями штаммов *Rhizobium* sp., взятыми в базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) США. Длина нуклеотидных последовательностей после выравнивания у различных

видов составила от 230 п. о. (*R. etli* 926-st) до 650 п. о. (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* 105). При этом все штаммы, за исключением представителей вида *R. galegae* и трех групп изолятов *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, давали 3 продукта ПЦР-амплификации, что указывало на наличие 3 копий генов тРНК (Глю) (рис. 4).



На основании проведенного нами анализа 54 исследованных штамма были отнесены к трем биоварам: *R. leguminosarum* bv. *viceae*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* и *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. 1 штамм относился к виду *R. etli* 700<sup>st</sup> (V класс *hin*-региона) и 6 штаммов к *R. galegae* (VI класс *hin*-региона). По данным *hin*-регион ПЦР-изоляты из клубеньков гороха представляли собой 6 групп штаммов, а изоляты из клубеньков бобов — 2 группы, относящиеся к I классу *hin*-региона (рис. 5). Симбионты клевера были разделены на 5 групп штаммов I класса *hin*-региона, две из которых выделены из почв Украины (рис. 5), а изоляты из клубеньков фасоли принадлежали к пяти генетически удаленным группам: *R. leguminosarum* (генотипы A, B, b, C, D) и *R. etli* (генотип G) (V класс *hin*-региона). Таким образом, на исследуемой выборке штаммов рода *Rhizobium*, выделенных из различных эколого-географических зон Украины, было выявлено 7 генотипов, каждый из которых отличался длиной и ДНК-последовательностью *hin*-региона. Всего в исследуемой выборке штаммов по ДНК-последовательности *hin*-региона было выделено 8 генотипов (табл. 1).

Разделение исследуемой выборки штаммов на генотипы по последовательности *hin*-региона совпадало с группированием штаммов по saAFLP. Однако корреляции между растением-хозяином, происхождением штамма и генотипами обнаружено не было. Некоторые штаммы, объединенные в один генотип, являлись симбионтами различных биоваров растений (например, бобов и клевера — генотип B, гороха и фасоли — генотип A). Штаммы, выделяемые одновременно с одной и той же посевной площади (например, симбионты гороха Уладовского района Херсонской области), представляли собой генетически удаленные по данным *hin*-регион ПЦР и saAFLP популяции, при этом большинство изолятов относились к генотипу A, что могло быть связано как с конкурентоспособностью штаммов данного генотипа, так и с численностью представителей этого генотипа в почве. Отсутствие данной корреляции было ожидаемым фактом, подтвержденным в исследованиях других ученых (Wernegreen et al., 1997). Оно связано с тем, что у бактерий рода *Rhizobium* все гены, определяющие его симбиотическую природу, как правило, находятся на плазмиде и способны переноситься от одного вида к другому, делая его сапрофитным или способным к симбиозу (Sullivan et al. 1995; Sullivan, Ronson, 1998). Мы же фокусируемся на изучении таксономической структуры рода, т. е. на изучении специфических генов и межгенных регионов хромосомной ДНК.

Далее, для выровненных секвенированных последовательностей *hin*-региона I класса *R. leguminosarum* был построен график, отражающий уровень ДНК-полиморфизма между тремя одноименными сайтами рестрикции *AvrII* со смещением 50-нуклеотидного окна с шагом в 1 п. о. (рис. 6). Исследования общего полиморфизма

нуклеотидных последовательностей на примере I класса *hin*-региона вида *R. leguminosarum* показали, что данный регион обладает высоким уровнем полиморфизма (до 15%) между штаммами разных биоваров. Таким образом, информативность предложенного нами локуса на два порядка выше, чем гена *16S* рРНК, сопоставима по своей разрешающей способности с методом секвенирования ITS и составляет 22 нуклеотидных замены на 100 п. о., что позволяет изучать бактерии на внутривидовом уровне.

Следует отметить, что полученные результаты для *hin*-региона коррелируют с результатами saAFLP и анализа сравнения нуклеотидных последовательностей *16S* рРНК и ITS. Однако предложенный нами таксономический маркер обладает существенным преимуществом — он является хромосомным, обладает большей разрешающей способностью и представлен в геноме единичной копией. Таким образом, ПЦР-анализ *hin*-региона является достоверным диагностическим инструментом для изучения внутривидового генетического полиморфизма популяции клубеньковых бактерий рода *Rhizobium*.

По результатам проведенного анализа структуры *hin*-региона были выявлены специфические нуклеотидные замены, в т. ч. протяженные вставки и делеции, характерные для видов и групп штаммов, выделенных с помощью анализа saAFLP. Эти данные позволяют подбирать таксон специфичные праймеры отдельно на каждую группу штаммов, обладающих идентичной последовательностью *hin*-региона.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами была разработана маркерная система, специфическая для клубеньковых бактерий рода *Rhizobium*, позволяющая разделить их на уровне вида и группы штаммов (табл. 2). Родоспецифичная ПЦР *hin*-регионов позволяет идентифицировать бактерии рода *Rhizobium*, а определение их нуклеотидных последовательностей дает информацию о внутривидовом разнообразии. Применение же анализа *hin*-регионов совместно с другими методами, представленными в таблице 2, дает полную картину о таксономии рода *Rhizobium* на любом уровне.

Данные, полученные с помощью анализа *hin*-регионов, согласуются с результатами традиционных техник, рассмотренных выше, но значительно превосходят их по своей информативности. Так, на основании проведенных нами исследований при сравнительном анализе ДНК последовательностей *hin*-регионов было выявлено 8 генотипов ризобий, выделенных из различных эколого-географических зон Украины, Разделение штаммов на группы совпадало с филогенией, полученной по последовательности гена *16S* рРНК, и группированием штаммов по результатам анализа saAFLP. Однако варибельность

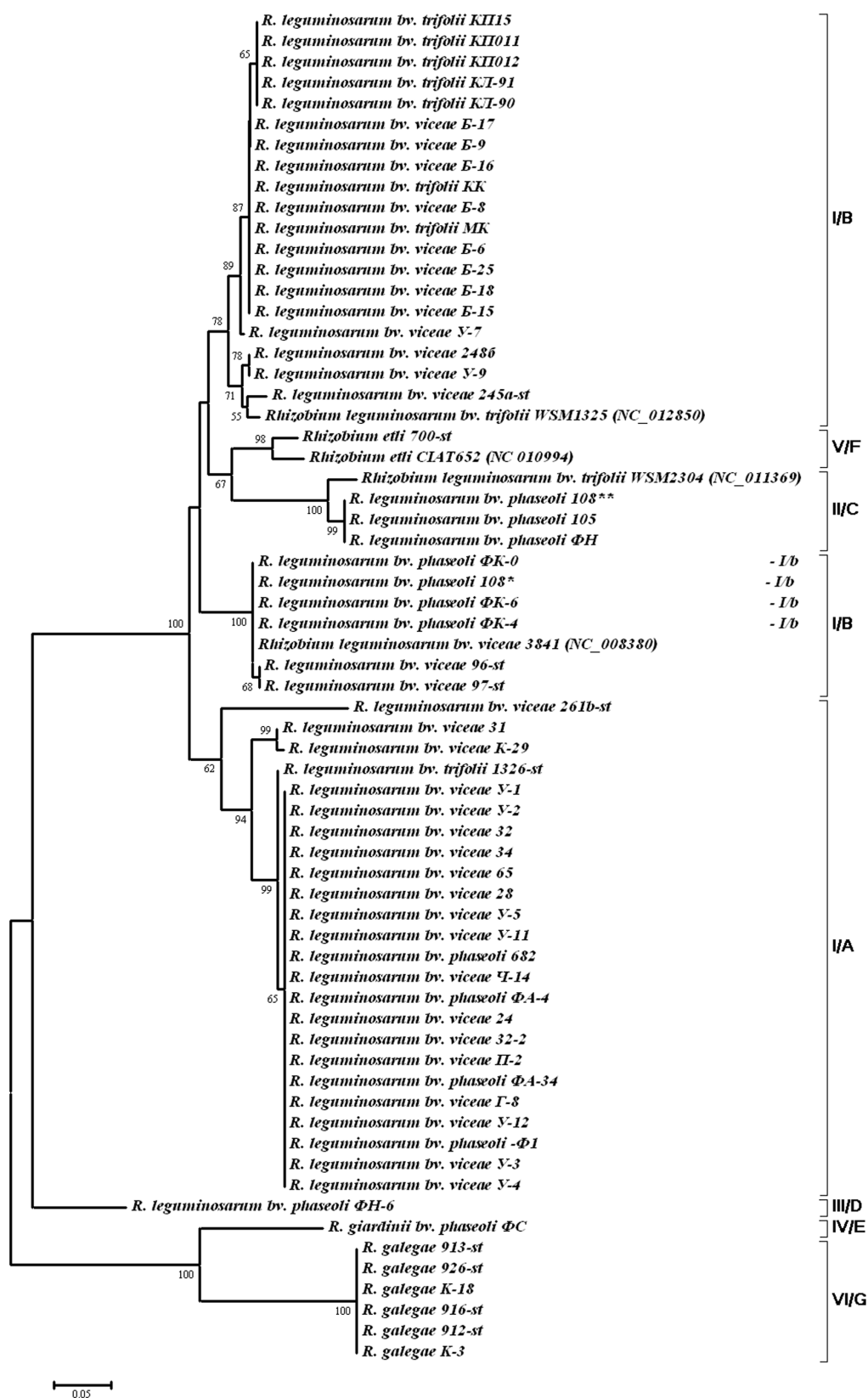
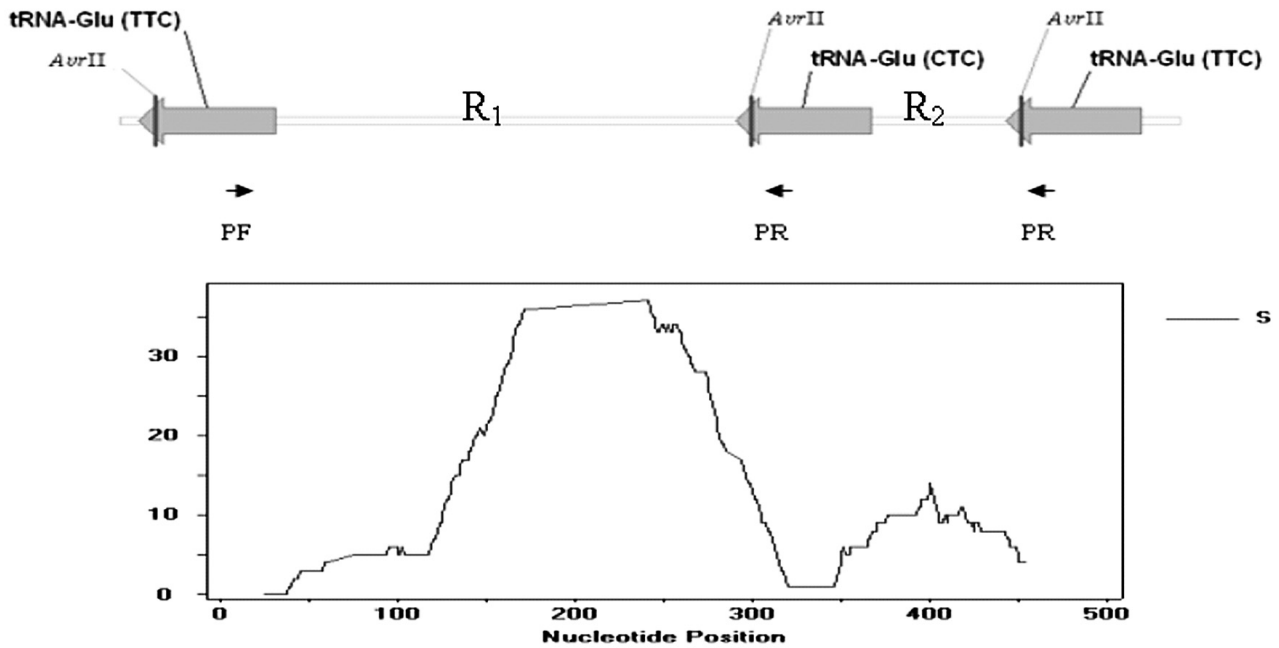


Рис. 5. Филогенетическое дерево, построенное на основе данных сравнительного анализа последовательностей *hip*-региона *Rhizobium* sp. с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 5 заменам на 100 пар оснований (генетическим дистанциям). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (%), определенная с помощью «bootstrap»-анализа (1000 реплик). Значения «bootstrap» ниже 70% не показаны



**Рис. 6.** График, построенный с помощью программного обеспечения DnaSP 5.10 (Rozas et al., 2010), показывает уровень полиморфизма *hin*-региона I класса для бактерий *R. leguminosarum* (по оси x указаны позиции среднего значения 50-нуклеотидного скользящего окна, по оси y — S — число сегрегирующих сайтов). *Hin*-регион представляет собой суммарную нуклеотидную последовательность из R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub>. Специфические для рода *Rhizobium* праймеры обозначены PF и PR. Зелеными стрелками показаны гены тРНК (Глю)

нуклеотидной последовательности *hin*-регионов внутри отдельных генотипов была выше и составляла от 3,3 до 77,5% (по сравнению с 0,1–1,2% для 16S рРНК и 3,2–19,2% для saAFLP).

Хотя пока остается до конца неясным происхождение и значение *hin*-региона для ризобий, на основании проведенных исследований можно предположить, что он является необходимым для их жизнедеятельности. Известно, что данная последовательность, аналогов которой не найдено ни в одном секвенированном геноме про- и эукариот, располагается между повторами генов тРНК (Глю), которые, в свою очередь, являются предшественниками на начальной стадии биосинтеза тетрапирролов (гемоглобинов и хлорофилла) в растениях, археях и бактериях (Jahn et al., 1992).

В клубеньках бобовых растений синтезируется легоглобин (леггемоглобин, Lb), симбиотический гемоглобин, который играет первостепенную роль в процессе азотфиксации: способствует переносу кислорода в симбиосомы, снабжая азотфиксирующих микросимбионтов связанным кислородом. С другой стороны, Lb выполняет буферные функции, связывая избыточный кислород, подавляющий каталитическую активность нитрогеназы (Топунов, Петрова, 2001; Космачевская, Топунов, 2009). Количество генов тРНК (Глю) и тип антикодона влияют на интенсивность биосинтеза Lb и возможность участия в биосинтезе других белковых соединений С5 метаболического пути (Levican et al., 2005).

Таблица 2

**Разрешающая способность фенотипических и генетических методов, используемых в данной работе для изучения биоразнообразия бактерий рода *Rhizobium***

Метод	Род <i>Rhizobium</i>	Вид	Био-вар	Группа штаммов
<b>Фенотипические методы</b>				
Биохимический анализ	+	+/-	-	-
Тест на инокуляцию растений-хозяев	+	+/-	+	-
<b>Генотипические методы</b>				
<i>hin</i> -регион ПЦР	+	+	-	+
saAFLP	-	+	+	+
ITS ПЦР-RFLP	-	+/-	-	+/-
секвенирование 16S рРНК	+	+	-	-
Секвенирование 16S-23S рРНК (ITS)	+	+	-	+

Нами был проведен предварительный поиск наличия транскрипционных факторов и промоторных областей в данном регионе (Reese, 2001). По результатам исследования регион R2 содержал консервативную область длиной 46 п.о., которая со 100% вероятностью для растений и 90% вероятностью для бактерий являлась промотором, содержащим GATA- и GCGC-мотивы и необходимым для распознавания белковыми молекулами сигнальной (иммунной) системы растений. Исследования региона R1 не выявили характерных промоторных областей и мотивов, кроме ТАТА-бокса. Однако вторичная структура данного региона была аналогичной у всех классов ДНК-последовательностей R1 и образовывала двухшпильчатую пространственную конформацию в позициях, примерно, —30 и —60 п.о.

Учитывая вышесказанное, можно предположить, что *hin*-регион является промотором генов тРНК (Глю), а его уникальная последовательность, возможно, является следствием совместной адаптации (эволюции) бактерий и растений-хозяев друг к другу.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (12–04–01809), совместного гранта РФФИ (10–04–90043 Бел\_а) — БРФФИ (Б10 Р-211) и Целевой программы Президиума РАН «Поддержка молодых ученых» и Программе научных исследований НААН Украины «Научные основы управления микробиологическими процессами в технологиях высокопродуктивного сельскохозяйственного производства (Сельскохозяйственная микробиология)».

## ЛИТЕРАТУРА

1. Возняковская Ю. М., Попова Ж. П. 1985. Методические указания по идентификации неспорных бактерий, доминирующих в ризосфере растений. Л.: ВНИИСХМ. 48 с.
2. Дідович С. В., Толкачов М. З., Бутвіна О. Ю. 2008. Ефективність симбіотичної азотфіксації в агроценозах України // Сільськогосподарська мікробіологія. Міжвідомчий тематичний наук. зб. ІСГМ УААН. Чернігів. Вип. 8. С. 117–125.
3. Зотов В. С., Пунина Н. В., Топунов А. Ф. Способ идентификации и дифференциации и прокариотических организмов. Заявка на патент. Рег. № 2011135461 от 25.08.2011.
4. Космачевская О. В., Топунов А. 2009. Гемоглобины — разнообразие структур и функций // Прикл. биохимия и микробиология. Т.45, № 6. С. 627–653.
5. Методы почвенной микробиологии и биохимии. / Под ред. Звягинцева Д. Г. — М.: изд-во МГУ, 1991. 303 с.
6. Новикова Н. И. 1996. Современные представления о филогении и систематике клубеньковых бактерий // Микробиология, Т. 65, № 4. С. 437–450.
7. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Хоул-та Дж., Крига Н., Снита П.; перевод с англ., в 2 т. М.: Мир, 1997. 1232 с.
8. Топунов А. Ф., Петрова Н. Э. 2001. Гемоглобины: эволюция, распространение и гетерогенность // Успехи биологической химии Т. 41, С. 199–228.
9. Altschul S. F., Gish W., Miller W. et al. 1990. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. Vol. 215. P. 403–410.
10. Amarger N., Macheret V., Laguerre G. 1997. Rhizobium gallicum sp. nov. and Rhizobium giardinii sp. nov., from Phaseolus vulgaris Nodules // Int. J. Syst. Bacteriol. Vol. 47, No. 4. P. 996–1006.
11. Beringer J. E. 1974. R1 transfer in Rhizobium leguminosamm // J. Gen. Microbiol. 84:188–198.
12. Eardly B. D., Nour S. M., van Berkum P., Seland-er R. K. 2005. Rhizobial 16S rRNA and dnaK genes: mosaicism and the uncertain phylogenetic placement of Rhizobium galegae // App. and Env. Mic. Vol. 71. No. 3. P. 1328–1335.
13. Frank B. 1889. Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen // Ber Deut. Bot. Ges. Vol. 7. P. 332–346.
14. Gaunt M. W., Turner S. L., Rigottier-Gois L. et al, 2001. Phylogenies of atpD and recA support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. Vol. 51. P. 2037–2048.
15. Gürtler V. and Stanisich V.A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region // Microbiology. Vol. 142. P. 3–16.
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. Vol. 41. P. 95–98.
17. Jahn D., Verkamp E., Söll D. 1992. Glutamyl-transfer RNA: a precursor of heme and chlorophyll biosynthesis // Trends. Biochem. Sci. Vol. 17 (6). P. 215–223.
18. Kimura M.A. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate at base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. Mol. Evol. Vol. 16. P. 111–120.
19. Kumar S., Tamura K., Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // Briefings in Bioinformatics. Vol. 5. P. 150–163.
20. Kwon S.-W., Park J.-Y., Kim J.-S. et al. 2005. Phylogenetic analysis of the genera Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Rhizobium and Sinorhizobium on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. Vol. 55. P. 263–270.



21. Laguerre G., Mavingui P., Allard M.-R. et al. 1996. Typing of Rhizobia by PCR DNA Fingerprinting and PCR-RFLP Analysis of Chromosomal and Symbiotic Gene Regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and Its Different Biovars // *App. and Env. Microbiol.* Vol. 62. P. 2029–2036.
22. Lindstrom K. 1989. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* Vol. 39. No. 3. P. 365–367.
23. Martinez E. 1994. Recent developments in *Rhizobium* genome // *Plant and Soil*, Vol. 161. P. 11–20.
24. Martínez-Romero E., Caballero-Mellado J. 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity // *Critical Rev. Plant Sci.* Vol. 15. P. 113–140.
25. Nei M., Kumar S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press. P. 336.
26. Normand P., Cournoyer B., Nazaret S., Simonet P. 1992. Analysis of a ribosomal operon in the actinomycete *Frankia* // *Gene*. Vol. 111. P. 119–124.
27. Palmer K.M., Young J.P.W. 2000. Higher Diversity of *R. leguminosarum* bv. viciae Populations in Arable Soils than in Grass Soils // *App. and Env. Microbiol.* Vol. 66. P. 2445–2450.
28. Reese M.G. 2001. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome // *Computers & Chemistry*. Vol. 26 (1). P. 51–56.
29. Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Под ред. Спайнка Г., Кондороши А., Хукаса П. Пер. с англ. СПб.: Бionт, 2002. 558 с.
30. Sanger F., Air G.M., Barrell B.G. et al. 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA // *Nature*. Vol. 265. P. 687–695.
31. Segovia L., Young J.P.W., Martinez-Romero E. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains in a new species, *Rhizobium etli* sp. nov // *Int. J. Sys. Bacteriol.* Vol. 43. P. 374–377.
32. Sullivan J.T., Patrick H.N., Lowther W.L., Scott D.B., Ronson C.W. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal and symbiotic gene transfer in the environment // *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 92. P. 8995–8999.
33. Sullivan J.T., Ronson C.W. 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene // *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 95. P. 5145–5149.
34. Suominen L., Roos C., Lortet G. et al., 2001. Identification and structure of the *Rhizobium galegae* common nodulation genes: evidence for horizontal gene transfer // *Mol. Biol. Evol.* Vol. 18. P. 907–916.
35. Terefework Z., Kaijalainen S., Lindström K. 2001. AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis* // *J. Biotechnol.* Vol. 91. P. 169–180.
36. Terefework Z., Nick G., Suomalainen S., Padin L. 1998. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria // *Int. J. of Syst. Bacteriology*. Vol. 48. P. 349–356.
37. 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.* Vol. 22. P. 4673–4680.
38. Vandamme P., Pot B., Gillis M. et al., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics // *Microbiol. Rev.* Vol. 60. P. 407–438.
39. Vessey J.K., Chemining'wa G.N. 2006. The genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae in cultivated soils of the eastern Canadian prairie // *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 38. P. 153–163.
40. Vinuesa P., Rojas-Jiménez K., Contreras-Moreira B. et al., 2008. Multilocus sequence analysis for assessment of the biogeography and evolutionary genetics of four Bradyrhizobium species that nodulate soybeans on the Asiatic continent // *App. and Env. Mic.* Vol. 74. P. 6987–6996.
41. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // *J. Bacteriol.* Vol. 173. P. 697–703.
42. Wernegreen J.J., Harding E.E., Riley M.A. 1997. *Rhizobium* gone native: unexpected plasmid stability of indigenous *Rhizobium leguminosarum* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 94. P. 5483–5488.
43. Zotov V.S., Punina N.V., Ignatov A.N. et al. 2010. Elaboration and use of new approach to species and strain identification of phytopathological and nitrogen-fixing bacteria // *Adaptation to Climate Change in the Baltic Sea Region: Contributions from Plant and Microbial Biotechnology. Program and Abstracts*, Finland, P. 87.

#### THE NEW TAXONOMIC MARKER OF NODULATION BACTERIA OF RHIZOBIUM GENUS AND ITS EVOLUTION

Zotov V.S., Punina N.V., Khapchaeva S.A., Didovich S.V., Melnichuk T.N., Topunov A.F.

✳ SUMMARY: The new taxonomic marker (*hin*-region) has been proposed, which gives possibility for *Rhizobium* bacteria study on

“species — group of strains” level. Using this marker the groups of *Rhizobium* strains were determined, which could not be distinguished with other methods, and these results correlated with evolutionary similarity of the bacteria. The developed approach for creating marker systems allows to carry out effective inventory of inter- and intra-species genetic diversity of nodulating bacteria and to evaluate perspectives of their use in agriculture. The proposed marker system was used for description of *Rhizobium* bacteria samples isolated from various ecological-geographical regions of Ukraine.

✿ **KEY WORDS:** Rhizobium; phylogeny; taxonomy; diversity; saAFLP; hin-region PCR; PCR-RFLP; 16S ribosomal RNA; 16S-23S ribosomal RNA.

✿ Сведения об авторах

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

**Пунина Наталия Владимировна** — к. б. н., научный сотрудник лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии им. А. Н. Баха РАН, научный сотрудник лаборатории ДНК-диагностики Медико-генетического научного центра РАМН. 119071, Россия, Москва, Ленинский проспект, 33. E-mail: hin-enkelte@yandex.ru.

**Халчаева Софья Арсеновна** — старший лаборант лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии им. А. Н. Баха РАН. 119071, Россия, Москва, Ленинский проспект, 33. E-mail: hapchaeva90@mail.ru.

**Дидович Светлана Витальевна** — к. с/х. н., старший научный сотрудник, заведующая лабораторией биологического азота и фосфора Отдела микробиологии Института сельского хозяйства Крыма Национальной академии аграрных наук Украины. 95453, Украина, АР Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150. E-mail: sv-alex.68@mail.ru.

**Мельничук Татьяна Николаевна** — к.с/х.н., старший научный сотрудник, заместитель директора по науке Института сельского хозяйства Крыма Национальной академии аграрных наук Украины. 95453, Украина, АР Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150. E-mail: melnichuk tn@ukr.net.

**Топунов Алексей Фёдорович** — д. б. н., руководитель лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии им. А. Н. Баха РАН. 119071, Россия, Москва, Ленинский проспект, 33. E-mail: aftopunov@yandex.ru.

**Vasily Sergeevich ZOTOV** — junior research scientist, Laboratory of Laboratory of biochemistry of nitrogen fixation and nitrogen metabolism, A.N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences. E-mail: adni83@yandex.ru.

**Natalia Vladimirovna PUNINA** — Ph.D., research scientist, Laboratory of biochemistry of nitrogen fixation and nitrogen metabolism, A.N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences; research scientist, Laboratory of DNA diagnostics, Research Centre for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences. E-mail: hin-enkelte@yandex.ru.

**Sofia Arsenovna KHAPCHAEVA** — senior technician, Laboratory of biochemistry of nitrogen fixation and nitrogen metabolism, A.N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Science. E-mail: hapchaeva90@mail.ru.

**Svetlana Vitalievna DIDOVICH** — Ph.D., senior research scientist, head of laboratory, Laboratory of biological nitrogen and phosphorus, Department of Microbiology, Institute of Agriculture of Crimea of National Academy of Agriculture Sciences of Ukraine. E-mail: sv-alex.68@mail.ru.

**Tatiana Nikolaevna MELNICHUK** — h.D., senior research scientist, Deputy Director on science, Institute of Agriculture of Crimea of National Academy of Agriculture Sciences of Ukraine. E-mail: melnichuk tn@ukr.net.

**Alexey Fedorovich TOPUNOV** — D.Sc., head of laboratory, Laboratory of biochemistry of nitrogen fixation and nitrogen metabolism, A.N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences. E-mail: aftopunov@yandex.ru.