

УДК 579.64:575.22:579.26

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ *LUPINASTER* SP.

Е.С. Иванова, Р.С. Гуменко, Г.М. Саргалиева, Ан.Х. Баймиев

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия, molgen@anrb.ru

Цель: исследование генетического разнообразия и филогении клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых растений рода *Lupinaster*, как мало изученных и перспективных для нужд сельского хозяйства. Методы: полимиразная цепная реакция (ПЦР) и ее модификации (RAPD, ПДРФ), секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей. Результаты. Было проанализировано 28 изолятов бактерий, выделенных из клубеньков растений рода *Lupinaster*. С помощью ПДРФ-анализа гена 16SpPHK исследуемые изоляты были сгруппированы в 6 гомогенных групп, которые в дальнейшем на основе сравнительных анализов последовательностей генов 16SpPHK и *recA* были отнесены к 2 группам клубеньковых бактерий: *Mesorhizobium* и *Rhizobium*. Филогенетический анализ на основе последовательностей симбиотических генов *nifH* и *nodC* показал их принадлежность только к роду *Mesorhizobium*. Область применения: сельское хозяйство. Выводы: впервые были выделены и исследованы микросимбионты бобовых растений *Lupinaster* sp.

Ключевые слова: бобово-ризобияльный симбиоз, гены «домашнего хозяйства», симбиотические гены, секвенирование.

Клубеньковые бактерии или ризобии – почвенные микроорганизмы, способные вступать в азотфиксирующий симбиоз с бобовыми растениями, обеспечивая их легкоусвояемой формой азота. Неотъемлемой составляющей геномов таких бактерий, являются симбиотические гены (*sym*-гены), характеризующиеся высокой мобильностью и подверженностью к горизонтальному переносу (ГПГ). Способность ризобий фиксировать атмосферный азот может значительно снижать зависимость сельского хозяйства от азотных удобрений. Природные популяции клубеньковых бактерий представляют собой ценный биоресурс при поиске бактериальных штаммов с полезными свойствами, инокуляция которыми позволит значительно повысить урожайность экономически важных сельскохозяйственных культур [Binde et al., 2009]. Поэтому исследования разнообразия и генетических характеристик природных популяций ризобий имеют несомненную практическую значимость, как для экологии, так и для сельского хозяйства.

Бобовые растения рода *Lupinaster* представляют для исследователей особый интерес, как с практической, так и с фундаментальной точек зрения. Они обладают ценными лекарственными, медоносными и декоративными свойствами. Кроме того представители данного рода характеризуются высокой зимостойкостью, малой осыпаемостью семян, а

также имеются сведения о хорошей поедаемости их крупным рогатым скотом, что делает их перспективными для использования в качестве кормовой культуры [Калинкина, 2013]. Но, несмотря на ряд положительных качеств, люпинник мало изучен и имеет сложное и весьма спорное систематическое положение [Павлова, 1989, 2006]. На сегодняшний день нет сведений и о микросимбионтах растений рассматриваемого рода, от которых напрямую зависит продуктивность бобового растения и которые благодаря своей тесной взаимосвязи со своим макросимбионтом являются важным генетическим признаком в систематике бобовых. Поэтому целью данной работы стало исследование генетического разнообразия и филогении ризобий, полученных из клубеньков бобовых растений рода *Lupinaster*.

Вначале был проведен общий анализ генетического разнообразия выделенных изолятов методом RAPD с использованием нескольких произвольных праймеров. Это позволило сократить количество образцов, за счет объединения микроорганизмов с идентичными RAPD-профилями в гомогенные группы, из которых в дальнейшем в работу брали только по одному образцу. На следующем этапе проводили предварительные филогенетические исследования методом ПДРФ-анализа гена 16SpPHK с использованием мелкощепящих рестриктаз (*BsuRI*, *Sse9I*, *HpaII*). Данный

этап позволил сгруппировать штаммы по филогенетически однородным группам. Для определения филогенетического положения исследуемых штаммов были секвенированы нуклеотидные последовательности фрагментов генов «домашнего хозяйства»: 16SpPHK размером около 1400 п.н. и *recA* размером около 500 п.н. и проведен их сравнительный анализ с уже известными аналогичными последовательностями из базы данных GenBank. Также были секвенированы последовательности *sym*-генов (*nifH* и *nodC*), кодирующих коровые части молекул, активно участвующих в становлении азотфиксирующего симбиоза.

В ходе работы было проанализировано 28 изолятов, полученных из клубеньков растений рода *Lupinaster*. Установлено, что они отличаются высоким полиморфизмом последовательности ДНК (13 гомогенных групп), хотя по ПДРФ-профилю гена 16SpPHK достаточно однородны (6

гомогенных групп). Определение филогенетического положения штаммов показало, что по последовательностям генов 16SpPHK и *recA* они делятся на 2 группы клубеньковых бактерий: *Mesorhizobium* и *Rhizobium*. В тоже время филогенетический анализ штаммов на основе последовательностей симбиотических генов *nifH* и *nodC* выявил, что все исследуемые микроорганизмы, являются родственными с бактериями рода *Mesorhizobium*. Такое несоответствие по филогении генов «домашнего хозяйства» и *sym*-генов можно объяснить широкой экспансией *sym*-генов в ассоциированных с растениями бактериальных сообществах посредством ГПГ, благодаря которой может происходить приобщение новых видов микроорганизмов к группе клубеньковых бактерий, а также формирование нетипичных для определенных видов бобовых растений штаммов ризобий.

Библиографический список (References)

Калинкина В.А. Морфо-биологические особенности проростков некоторых видов рода *Trifolium* L. // Modern Phytomorphology. 2013. P. 201–206.
Павлова Н.С. Сем. Бобовые – Fabaceae Lindl s.l. Сосудистые растения советского Дальнего Востока. М.: Наука, 1989. Т. 4. С. 191–339.
Павлова Н.С. Сем. Бобовые – Fabaceae Lindl s.l. Дополнения и изменения к изданию «Сосудистые растения советского Дальнего Востока» Владивосток: Дальнаука, 2006. Т. 1–8 (1985–1996). С. 173–174.

Binde D.R, Menna P, Bangel E.V, Barcellos F.G, et al. Rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains // Appl. Microbiol. Biotechnol, 2009. V. 83. P. 897–908.

Plant Protection News, 2016, 3(89), p. 75–76

GENETIC CHARACTERISTIC OF RHIZOBIA ISOLATED FROM *LUPINASTER* SP.

E.S. Ivanova, R.S. Gumenko, G.M. Sargaleeva, An.Kh. Baymiev

Institute of Biochemistry and Genetics Ufa Scientific Centre RAS, molgen@anrb.ru

The aim of this research: a study of genetic diversity and phylogeny of insufficiently explored and promising for agriculture rhizobia isolated from wild legumes *Lupinaster* sp. Methods: Polymerase chain reaction with modification (RAPD, PCR-RFLP), sequencing and analysis of the nucleotide sequences. Results: A total of 28 bacterial isolates from the root nodules of *Lupinaster* sp. were analyzed. These isolates were classified into 6 types of 16S ribosomal DNA (rDNA) using PCR-RFLP analysis. They were grouped into 2 clades: *Mesorhizobium* и *Rhizobium*, when the phylogenies of 16S rDNA and *recA* genes were applied. Phylogenetic analysis of *nifH* and *nodC* genes showed that all isolates were identified as *Mesorhizobium*. Application area: agriculture. Conclusions: The microsymbionts of legumes *Lupinaster* sp. were for the first time isolated and analyzed.