

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

ХАПЧАЕВА СОФЬЯ АРСЕНОВНА

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ МАРКИРОВАНИЕ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ
И СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ БОБОВО-
РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА**

03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. В настоящее время растительно-микробные взаимодействия, в частности бобово-ризобиальный симбиоз, изучены достаточно хорошо. Выявлены и охарактеризованы генетические основы и молекулярные механизмы, определена значимость подобных систем для изучения ряда фундаментальных и прикладных вопросов биологии. Однако, в выявлении специфичности растительно-микробных взаимодействий остается много вопросов. До конца непонятно влияние внешних и внутренних биотических факторов, определяющих симбиоз между конкретными растениями семейства Бобовые (*Fabaceae*) и штаммами различных родов семейства *Rhizobiaceae* из общего пула почвенных микроорганизмов, что на практике не позволяет полностью использовать природный потенциал таких взаимодействий.

Для оценки специфичности растительно-микробных взаимодействий важную роль играют идентификация и дифференциация микросимбионтов - ризобиальных культур. Генотипирование позволяет выявить группы штаммов (генотипы ризобий), обладающие различной нодуляционной конкурентоспособностью – способностью формировать клубеньки в присутствии других вирулентных штаммов [Онищук с соавт., 2017].

Новые описанные виды клубеньковых бактерий периодически пересматриваются Международным комитетом по систематике прокариот (Подкомитет по таксономии агробактерий и ризобий, ICSP Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium* - <http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy/>). Было опубликовано несколько обзоров по ризобиальной таксономии [Zakhia et al., 2001; Sawada et al., 2003; Willems, 2006], но ни один из них не был специально ориентирован на геномику. Даже с применением современных молекулярно-генетических методик достаточно сложно однозначно разделять уже известные виды клубеньковых бактерий, реклассифицировать их или вводить и описывать новые [Rao et al., 2018]. Вследствие этого актуальным является поиск генетических маркеров, позволяющих идентифицировать и дифференцировать ризобии на внутривидовом уровне.

Один и тот же генотип (группа штаммов) ризобий может вступать в симбиоз с разными сортами бобового растения с неодинаковой эффективностью [Волобуева с соавт., 2016]. Оценка биоразнообразия ризобиальных штаммов позволяет расширить имеющиеся знания в области специфичности бобово-ризобиального симбиоза и создавать микробные биопрепараты, наиболее полно раскрывающие природный потенциал сорта и повышающие эффективность растительно-микробных взаимодействий.

Цель работы: повысить эффективность бобово-ризобиального симбиоза посредством разработки персонализированных формул полифункциональных биопрепаратов.

Задачи:

1. Изучить биоразнообразие микросимбионтов бобовых культур: фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*), сои культурной (*Glycine max*) и растений трибы *Vicieae* (*Vicia*, *Pisum*, *Lens*, *Lathyrus*) при помощи анализа данных мультилокусного секвенирования (MLSA) и saAFLP.
2. Определить уровень генетического полиморфизма по каждому из маркеров (генов 16S рРНК, *rpoB*, *nodD*, *nodC*, *nifH*; межгенного региона 16-23S рРНК), в т.ч. провести сравнительную оценку структуры и полиморфизма *hin*-региона.

3. Изучить в рамках лабораторных испытаний особенности бобово-ризобиального симбиоза, как предпосылку сорт-штаммовой специфичности.
4. Оценить возможность использования микроводорослей и цианобактерий при создании консорциумов полезных микроорганизмов, их влияние на эффективность действия и стабильность состава таких биопрепаратов в процессе хранения.
5. Апробировать в рамках полевых опытов гипотезу создания персонализированных формул биопрепаратов под бобовые культуры.

Научная новизна. Впервые проведена сравнительная оценка структуры и полиморфизма *hin*-региона для всех известных на настоящее время микросимбионтов фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) и растений трибы *Viciae*. Существенно расширена база данных по *hin*-региону и проведена ревизия таксономического положения исследуемых штаммов рода *Rhizobium*, что подтверждает перспективность использования данного маркера в бактериальной систематике и таксономии.

В ходе изучения специфичности бобово-ризобиальных взаимодействий на примере растений трибы *Viciae* впервые была выявлена сцепленность хромосомного маркера *hin*-региона с плазмидным *nodD*-геном штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. При анализе тотальной ДНК клубеньков с использованием *hin*-регион ПЦР для симбионтов растений трибы *Viciae* впервые был выявлен генотип - HF (Heavy Fragment), присутствующий у аборигенных ризобий, обладающих повышенной конкурентоспособностью. Изолят с новым генотипом был выделен в чистую культуру и для него было проведено полногеномное секвенирование.

В рамках полевых испытаний показана фенотипическая изменчивость фасоли обыкновенной (расщепление морфотипа семян по цвету, форме и содержанию белка), вероятно связанная с генотипами интродуцированных штаммов клубеньковых бактерий, что в свою очередь принципиально влияет не только на количество, но и качество урожая данной культуры.

Впервые предложен и научно обоснован способ повышения эффективности бобово-ризобиального симбиоза посредством разработки персонализированных формул полифункциональных биопрепаратов.

Практическая значимость работы. Предложенные в работе экспресс-методики идентификации и дифференциации штаммов клубеньковых бактерий в совокупности с вегетационными испытаниями позволяют выявлять перспективные штаммы для использования в качестве основы для биопрепарата под бобовые культуры.

В ходе работы были определены перспективные штаммы, наиболее эффективно вступающих в азотфиксирующий симбиоз с горохом и соей, и депонированы во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов (ВКПМ В-12661, ВКПМ В-12660). Получены патенты на штаммы, как на ризобиальные компоненты микробного биопрепарата.

В рамках лабораторного опыта было доказано влияние добавления микроводорослей или цианобактерий в биопрепарат на стабильность его действия.

Проводимая в рамках диссертации научно-исследовательская работа легла в основу разработки биотехнологии получения микробных полифункциональных препаратов, поддержанной грантами Фонда содействия развитию малых форм

предприятий в научно-технической сфере (конкурсы «УМНИК», «СТАРТ-1», «Развитие»), Фонда поддержки научно-практической деятельности студентов, аспирантов и молодых ученых «Национальное интеллектуальное развитие» (конкурс «Эврика!Концепт») и Инновационного центра Сколково (конкурс «Агрогенетика - 2016»).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Генетический маркер *hin*-регион – перспективный таксономический маркер для идентификации и оценки внутривидового разнообразия бактерий рода *Rhizobium* и выявления сорт-штаммовой специфичности бобово-ризобияльного симбиоза.
2. Применение микроводорослей и цианобактерий при создании консорциумов полезных микроорганизмов приводит к стабилизации состава комплексного биопрепарата.
3. Предложен способ повышения эффективности бобово-ризобияльного симбиоза посредством разработки персонализированных формул полифункциональных биопрепаратов.

Апробация работы. Результаты работы были доложены на следующих конференциях: Международная школа-конференция молодых ученых «Растительно-микробные сообщества: молекулярные основы адаптивного потенциала», (Крым, Алушта, 2012); 17-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», (Пушино, Россия, 2013); 12th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology (BAGECO12), (Ljubljana, Slovenia, 2013); 42nd Annual meeting ESNA 2013, (Thessaloniki, ELLAS (Greece), 2013); XIII з`їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, (Украина, Ялта, 2013); 18-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», (Пушино, Россия, 2014); 43rd Annual meeting ESNA 2014, (Bolzano, Italy, 2014); 11th European Nitrogen Fixation Conference, (Tenerife, Canary Islands, Spain, 2014); 44th Annual meeting ESNA 2015, (Brno, Czech Republic, 2015); X Молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», (Москва, Россия, 2015); III Международная научная конференция «Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки» (Республика Крым, Россия, 2018).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 2 статьи в журналах, входящих в базы Web of Science и Scopus; 2 патента, 5 статей в журналах, входящих в базу РИНЦ; и 1 публикация в других периодических изданиях и сборниках; а также 12 тезисов в материалах отечественных и международных конференций.

Объем и структура работы. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждения, заключение, перечень публикаций по теме диссертации и списка литературы. Работа изложена на 125 страницах текста, иллюстрирована 36 рисунками, включает 22 таблицы. Список литературы состоит из 176 источников, из них 162 зарубежных авторов.

Личный вклад диссертанта. Диссертантом проведены основная часть экспериментальных работ, представленных в диссертации, обработка полученных

данных, подготовка материалов к публикациям, докладам и выступлениям и написание текста диссертационной работы.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю д.б.н. Топунову А.Ф. за руководство и помощь на всех этапах работы, к.б.н. Зотову В.С. за всестороннюю поддержку, консультации и методологическую помощь при выполнении исследовательской деятельности. Также автор выражает благодарность за помощь сотрудникам лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота и группы альгобиотехнологии ФИЦ Биотехнологии РАН.

Автор глубоко признателен к.с.-х.н. Дидович С.В. за предоставленную микробиологическую коллекцию, а также [Наумкиной Т.С.], Суровой Г.Н. и Васильчикову А.Г. за предоставленные сорта и сортообразцы бобовых культур и помощь в проведении апробации биопрепаратов в полевых опытах.

Автор выражает искреннюю благодарность руководству ФИЦ Биотехнологии РАН в лице Попова В.О. и Садыхова Э.Г. за всестороннюю поддержку данной тематики исследований, а также Технологической платформе «БиоТех 2030», в лице исполнительного директора Осьмаковой А.Г., за помощь в продвижении проекта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Бактериальные штаммы и ассоциации. В качестве объектов исследования в работе были использованы 96 штаммов клубеньковых бактерий видов *Rhizobium* sp. и *Bradyrhizobium* sp. из Крымской коллекции микроорганизмов ФГБУН «НИИ сельского хозяйства Крыма» (Симферополь, Республика Крым). Исследуемая выборка представлена микросимбионтами различных бобовых культур: фасоль обыкновенная *Phaseolus vulgaris* L. (43 шт.), горох посевной *Pisum sativum* L. (22 шт.), бобы *Vicia faba* L. (13 шт.) и соя *Glycine max* L. (18 шт.).

11 типовых штаммов клубеньковых бактерий были получены из различных отечественных и зарубежных коллекций (ВКПМ, DSMZ, ВССМ/LMG) и использованы в качестве сравнения.

Бобовые растения. В качестве макросимбионта в данной работе были исследованы основные возделываемые сельскохозяйственные бобовые культуры – различные сорта отечественной и зарубежной селекции фасоли обыкновенной (Гелиада, Рубин, Стрела, Шоколадница; сортообразцы – 08-543, 09-147, 05-82, 09-180); гороха посевного (Девиз, Софья, Сахарный, Фараон, Жегалова 112, Амброзия, Подружка, Спартак, Детский); боба обыкновенного (Билун); сои культурной (Зуша, Красивая Меча, Магева, Semu-315, MON-23); чечевицы пищевой (*Lens culinaris* L.) – Линза; чины посевной (*Lathyrus sativus* L.) – Сподиванка.

Штаммы микроводорослей и цианобактерий. Для анализа влияния микроводорослей и цианобактерий на функционал и стабильность монокомпонентного биопрепарата на основе эффективных ризобийных штаммов были использованы культуры альгологически чистой зелёной микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (коллекция кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова) и почвенной цианобактерии *Nostoc linckia* CCM 144 (ACSSI 271 – Альгологическая коллекция ИФХиБПП РАН – Algal Collection of Soil Science Institute).

Клубенек-образующие единицы (КЛОЕ). Для оценки способности штамма образовывать клубеньки введен термин - клубенек-образующая единица (КЛОЕ). С

целью определения генотипов КлОЕ, минуя стадию получения чистых культур, клубеньки растирали пестиком в 200 мкл MQ и затем выделяли тотальную ДНК с помощью фенол-хлороформного метода.

Культивирование микроорганизмов. Чистые культуры клубеньковых бактерий хранили на минимальных средах при 3-4°C в холодильнике. Исходную культуру ризобий пересевали на минимальную агаризованную среду ТУ следующего состава (г/л) (рН – 7,0-7,2): триптон – 10; дрожжевой экстракт – 1,0; CaCl₂ – 0,4; Агар – 15,0 [Beringer, 1974]. Чашки Петри выдерживали в термостате при 28-30°C в течение 3 суток. Питательные среды готовили на водопроводной воде и стерилизовали при 1 атм в течение 30-40 мин.

Выделение ДНК. Выделение бактериальной ДНК проводили посредством фенол-хлороформной экстракции и последующего осаждения изопропанолом. Концентрацию выделенной ДНК определяли при помощи флюориметра Qubit 2.0 с использованием набора реагентов Qubit Assays. Также были использованы наборы для выделения ДНК: Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification Kit, Invitrogen PureLink Genomic DNA Kit.

Генотипирование штаммов. Таксономию и филогенетические связи штаммов и бактериальных изолятов изучали с помощью MLSA анализа по ряду хромосомных, симбиотических генов и межгенных регионов. ПЦР анализ и последующее секвенирование нуклеотидных последовательностей проводили с использованием следующих праймеров: **16S рРНК** - FD1 и RD1 [Weisburg et al., 1991]; **16S-23S рРНК** - FGPS1490-72 [Normand et al., 1992] и ITS_R [Зотов с соавт. 2012]; **groB** - groB_F и groB_R [Пунина с соавт, 2013, Martens et al., 2008]; **hin-регион** - rhizF и rhizR [Патент № 2486251, 2011]; **nodD** - NBA12 и NBF12' [Laguerre et al., 1996]; **nodC** - nodCГ' и nodCF', **nifH** - nifHF и nifHI [Laguerre et al., 2001]. Состав ПЦР-смеси соответствовал протоколу производителя (ЗАО «Евроген», Россия). Разделение амплифицированных фрагментов проводили при помощи электрофореза в 1.5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия и последующей визуализацией на трансиллюминаторе. Единичные целевые фрагменты маркерных генов (ПЦР-продукты) подвергали ферментативной очистке (к 10 мкл ПЦР-продукта добавить 0,025 мкл нуклеазы ExoI (20ед/мкл), 0,05 мкл SAP (1ед/мкл), 0,35 мкл буфера SAP и 9,575 мкл MQ; температурно-временной режим - 37°C (40 мин.), 80°C (15 мин.)), а затем определяли нуклеотидные последовательности посредством прямого секвенирования по методу Сэнгера.

Анализ длин рестрикционных фрагментов (RFLP). Продукты амплификации исследуемых генов (*nodD*, *groB*) обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *MspI* согласно инструкциям производителя («Fermentas», США). Продукты рестрикции ДНК анализировали путем электрофоретического разделения в 3.0 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия и последующей визуализацией на трансиллюминаторе.

Single adapter AFLP анализ. Комбинацией ПЦР и ДНК-рестрикции является метод AFLP - Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis. В данной работе был использован модифицированный метод saAFLP [Зотов, 2013]. Выделенную из образца ДНК расщепляли рестриктазами, далее проводили лигирование с адаптерами и последующую амплификацию с праймерами, специфичными для адаптеров. Рестрикционный анализ проводили одновременно с легированием в 10

мкл смеси, содержащей 80 нг образца ДНК, 1х лигазный буфер, 10 пкМ одноцепочечного адаптера, 5 ед. T4 ДНК лигазы и 1 ед. рестриктазы (*Xma*I, *Xba*I, *Asu*NI). Полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 2 часов, после чего доводили реакционный объем до 100 мкл. ПЦР в 25 мкл смеси: 1х буфер для ПЦР, 2,8 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTP, в качестве ДНК-матрицы - 2 мкл рестрикционно-лигазной смеси, 0,4 мкМ праймера, комплементарного адаптеру, и 1 ед. Taq ДНК-полимеразы.

Методы лабораторного и полевого вегетационных опытов. Лабораторные опыты проводили в 0,5 литровых пластиковых стаканах в климатических камерах при 12 часовом светодиодном освещении (белый и комбинированный свет, 6000 Лк). Субстратом являлся стерильный вермикулит (фракция – 1-4 мм). Инокуляцию проводили в объеме – 50 мкл бактериальной суспензии с титром 10⁹КОЕ/мл на семя. Семена перед посевом выдерживали в 70 % этаноле 2 мин, а затем 3 раза промывали в стерильном дистилляте. После посева добавляли питательную смесь Прянишникова в объеме 100 мл на стакан.

Полевые испытания проводили согласно методике [Волкогон с соавт., 2010]. Предпосевную инокуляцию бактериальной суспензией проводили в объеме 2 % от веса семян с титром не менее 10⁹ КОЕ/мл.

Метагеномное секвенирование нового поколения (NGS). Препараты ДНК (10-15 нг) были использованы в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции для создания и последующего секвенирования ампликонных библиотек. В ПЦР-реакции были использованы универсальные праймеры к варибельному участку V4 гена 16S рРНК (F515 R806) и полимеразы Encuslo. Температурный профиль реакции: 95°C – 30 сек., 50°C – 30 сек., 72°C – 30 сек.; всего 30 циклов [Чирак, 2013]. Подготовку проб и секвенирование проводили на приборе GS Junior («Roche», Швейцария). Таксономический анализ нуклеотидных последовательностей ампликонных библиотек осуществляли с помощью программы QIIME, таксономическую идентификацию OTU - с использованием базы данных Greengenes.

Полногеномное секвенирование. Образцы штаммов клубеньковых бактерий, выделенных из полевого опыта, в объеме 5 мл суточной культуры были переданы компании ООО «Генотек» (Россия) для проведения секвенирования с использованием техники секвенирования нового поколения (NGS) на платформе Illumina HiSeq2500.

Биоинформационный и статистический анализ. Первичный сравнительный анализ полученных последовательностей с последовательностями базы данных ГенБанка проводили с помощью программы NCBI Blast. Проверка и редактирование осуществляли с помощью редактора «BioEdit 7.0.5.2». Филогенетические деревья были построены в программе Mega 5.1 с помощью алгоритмов Neighbor-Joining NJ и Maximum likelihood estimation. Попарные генетические расстояния между последовательностями определяли по двухпараметрической модели Кимуры. Уровень нуклеотидного полиморфизма вычисляли в программе DnaSP 5.10.

Анализ общего содержания белка. Использовали метод Кьельдаля, определение проводили в аппарате фирмы Bushi на приборе K-424 (Германия) согласно ГОСТ 10846-91 «Зерно и продукты его переработки» в трехкратной повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ*

Клубеньковые бактерии ГПИ трибы Viciae (Vicia, Pisum, Lens, Lathyrus).

Взаимодействия между растениями трибы Viciae и *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (*Rlv*) считаются одними из наиболее специфичных. Клубеньковые изоляты этих растений классифицированы в биовар (bv.) *viciae* вида *R. leguminosarum*, которые способны к перекрестной инокуляции представленных растений-хозяев, объединенных в группу перекрестной инокуляции. Эффективность симбиотической азотфиксации штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae* разная, определяемая в том числе и нодуляционной конкурентоспособностью конкретного генотипа ризобий, а именно – способностью формировать клубеньки на фоне других вирулентных штаммов. В настоящее время известны следующие ризобиальные микросимбионты данных растений: *R. pisi*, *R. fabae*, *R. anhuiense*, *R. laguerreae*.

Анализ хромосомных маркеров (16S рРНК, *rpoB*) определил принадлежность штаммов из исследуемой выборки к виду *Rhizobium leguminosarum*. Всего достоверно выявляются 5 кластеров штаммов, соответствующих вышеописанным видам. При анализе межгенного *hin*-региона исследуемые штаммы разделились на 2 группы генотипов: IА-генотип, определяющий ризобии, выделенные из клубеньков гороха, и IВ-генотип, определяющий ризобии, выделенные из клубеньков бобов (рис.1).

В результате анализа симбиотических генов была выявлена кластеризация штаммов в соответствии с растением-хозяином и географией произрастания. Культура *Vicia faba* в диком виде не встречается, в связи с чем, будучи интродуцированной, она имеет ограниченный круг естественных микросимбионтов, что приводит к низкому уровню генетического разнообразия симбиотической части бактериальных геномов (*sym-4*). Напротив, горох имеет множество природных родственников, симбионты которых могут успешно выступать донорами симбиотических генов для взаимодействия с *Pisum sativum*, что и обуславливает наблюдаемое генетическое разнообразие его симбиотических генов – *sym-1*, *sym-2*, *sym-3*.

Сопоставляя данные исследованных генетических маркеров, можно заключить, что существует положительная корреляция между хромосомным *hin*-регионом и *sym*-генами: генотип I/A сцеплен с *sym*-генотипом, характерным для симбионтов гороха, а генотип I/B - с *sym*-генотипом, характерным для симбионтов бобов. Таким образом, совместное использование таких методик, как *hin*-регион ПЦР и *nodD*-RFLP, позволяет проводить экспресс идентификацию и дифференциацию микросимбионтов растений ГПИ.

В таблице 1 представлена структура *hin*-региона у исследуемых штаммов и штаммов-микросимбионтов растений ГПИ, полные геномы которых представлены в открытых базах данных.

* Все представленные результаты опубликованы в статьях:

- Хапчаева С.А. с соавт., 2018. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen16451-60>.

- Хапчаева С.А. с соавт., 2018. DOI: [10.25637/TVAN2018.04.16](https://doi.org/10.25637/TVAN2018.04.16).

- Дидович С.В., Зотов В.С., Хапчаева С.А., Топунов А.Ф. Штамм *Bradyrhizobium diazoefficiens* ССМ GS-4 (ВКПМ В-12660) – ризобиальный компонент микробного биопрепарата для предпосевной обработки сои. Дата приоритета – 20.01.2017г. Патент на изобретение № 2654580.

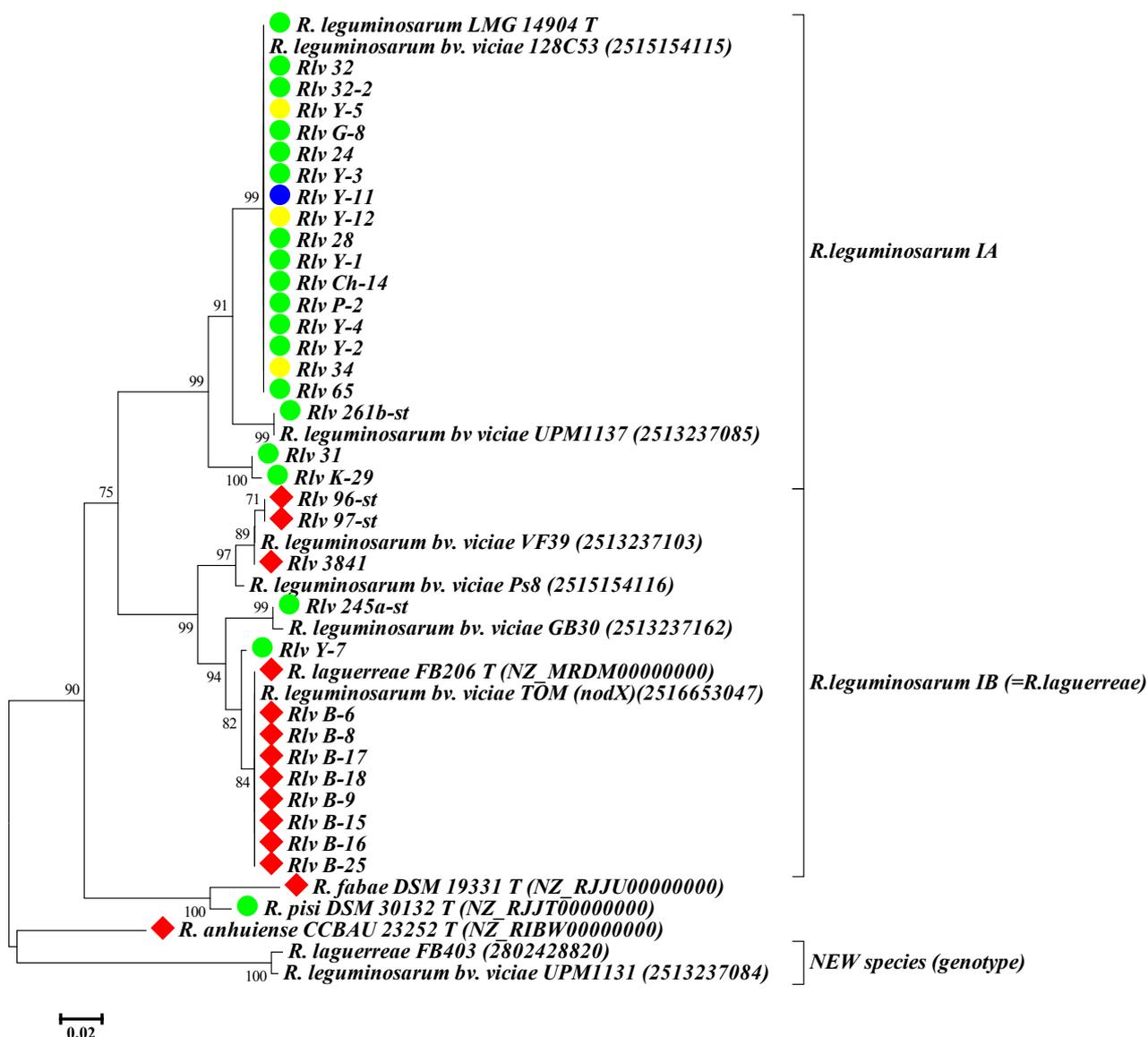


Рисунок 1. Филогенетическое дерево, построенное по нуклеотидным последовательностям маркера - *hin*-регион с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 2 заменам на 100 пар оснований. Сым-1 (●); сым-2 (●); сым-3 (●); сым-4 (◆). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap» - анализа 1000 реплик. Значения «bootstrap» ниже 70% не показаны.

Rhizobium leguminosarum IA (Ia) - самый распространенный генотип ризобий - симбионтов растений гороха, клевера и фасоли. Принципиальное отличие генотипа *Rhizobium leguminosarum* IB (= *Rhizobium laguerreae*) от *R. leguminosarum* IA — это вставка в 75 п.о. в промоторной области второй копии гена тРНК-Глу (СТС). Уровень межвидового полиморфизма по данному маркеру при этом от 11 % и выше. Новый генотип, представленный штаммом *Rhizobium leguminosarum* UPM1131, образован посредством вставки в 176 п.о. между 2 и 3 копиями гена тРНК-Глу.

Наиболее полиморфной на внутривидовом уровне является группа штаммов, которая принадлежит к генотипу *R. leguminosarum* IB (= *R. laguerreae*), сходство составило ≥ 92 %. У группы штаммов *R. leguminosarum* IA - ≥ 94 %. На межвидовом уровне наиболее отдаленными являются генотипы *R. anhuiense* и *R. fabae* (44 %), а наиболее близкими - *R. pisi* и *R. fabae* (93 %).

Таблица 1. Структура *hin*-региона различных генотипов штаммов-симбионтов растений ГПИ трибы *Viciae*.

№	Генотип	Типовой штамм	Кол-во штаммов	Структура	Длина <i>hin</i> -региона, п.о.	Уровень внутривидового (внутри генотипа) полиморфизма	Номер последовательности <i>hin</i> -региона (генома) базах данных GenBank NCBI / IMG/MER JGI
1	<i>Rhizobium anhuiense</i>	ССBAU 23252 T	1		737	-	NZ_RIBW00000000
2	<i>Rhizobium fabae</i>	ССBAU 33202 T	1		1753	-	NZ_RJJU00000000
3	<i>Rhizobium leguminosarum</i> IA (Ia)	LMG 14904 T	22		401 248 (для Ia)	6%	KC462465 (<i>Rlv</i> 32-2)
4	<i>Rhizobium leguminosarum</i> IB (= <i>Rhizobium laguerreae</i>)	FB206 T	18		470	8%	NZ_MRDM00000000
5	<i>Rhizobium pisi</i>	DSM 30132 T	1		403	-	NZ_RJIT00000000
6	Новый генотип	UPM1131	2		501	2%	2513237084

Клубеньковые бактерии – симбионты фасоли (*Phaseolus vulgaris*). Фасоль обыкновенная способна вступать в симбиоз с широким спектром азотфиксирующих клубеньковых бактерий, большая часть которых представлена различными видами рода *Rhizobium*. Выбор микросимбионта обусловлен разными внешними и внутренними факторами, поэтому достаточно сложно выявить специфичность в данном виде растительно-микробных взаимодействий. Обнаружение, изучение и оценка генетического разнообразия новых клубеньковых бактерий, образующих активные клубеньки на корнях фасоли, приблизят исследователей к решению этого вопроса [Martinez-Romero, 2003]. Фасоль обыкновенная (*Phaseolus vulgaris* L.) представляет интерес в исследовании специфичности симбиотических взаимодействий, т. к. способна к перекрестному заражению большим числом микросимбионтов неродственных видов бобовых растений.

В настоящее время известны следующие ризобияльные микросимбионты фасоли: *R. leguminosarum*, *R. vallis*, *R. acidisoli*, *R. phaseoli*, *R. etli*, *R. mesoamericanum*, *R. tibeticum*, *R. lusitanum*, *R. leucaenae*, *Pararhizobium giardinii*, *R. hidalgonense*, *R. tropici* type B, *R. aethiopicum*, *R. anhuiense*, *R. esperanzae*, *R. gallicum*, *R. azibense*, *R. ecuadorensis*, *R. freirei*, *Sinorhizobium fredii*.

Таксономическая кластеризация исследуемых штаммов по хромосомным маркерам 16S рРНК и *rpoB* выявила принадлежность к двум видам рода *Rhizobium* – *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* и недавно переименованному роду *Pararhizobium* – *P. giardinii* [Mousavi et al., 2015]. В результате анализа симбиотических генов было выявлено 8 *sym*-генотипов (рис. 2). Исследуемые штаммы кластеризуются в 3 группы: *sym*-1 и *sym*-2 – *R. leguminosarum* с высоким уровнем полиморфизма, в эти симбиовары вошли генетически удаленные штаммы разных видов, что вероятно свидетельствует о горизонтальном переносе симбиотических генов между разными микросимбионтами фасоли; и более однородную *sym*-4 – *P. giardinii*. Представленный полиморфизм ризобияльных штаммов, способных инокулировать фасоль, очевидно обусловлен независимой эволюционной историей данных генов.

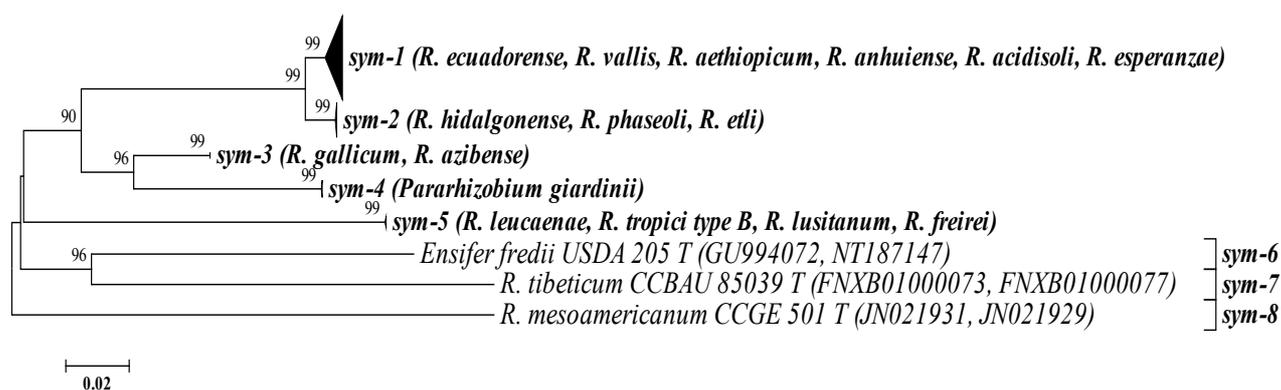


Рисунок 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе совокупных данных сравнительного анализа полных нуклеотидных последовательностей генов *podC* и *nifH* бактерий рода *Rhizobium* с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 2 заменам на 100 пар оснований. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap» - анализа 1000 реплик. Значения «bootstrap» ниже 70 % не показаны.

Таблица 2. Структура *hin*-региона различных генотипов штаммов-симбионтов фасоли обыкновенной.

№	Генотип	Типовой штамм	Кол-во штаммов	Структура	Длина <i>hin</i> -региона, п.о.	Уровень внутривидового (внутри генотипа) полиморфизма	Номер последовательности <i>hin</i> -региона (генома) базах данных GenBank NCBI / IMG/MER JGI
1	<i>Rhizobium acidisoli</i>	FH13 T	1		497	-	NZ_CP034998
2	<i>Rhizobium esperanzae</i>	CNPSo 668 T	1	н/д	н/д	н/д	NZ_CP013500
3	<i>Rhizobium gallicum</i>	R602sp T	1		401	-	NZ_ARDC00000000
4	<i>Pararhizobium giardinii</i>	H152 T	6		262	4%	NZ_ARBG00000000
5	<i>Rhizobium hidalgonense</i>	FH14 T	1		4210	-	NZ_LODW00000000
6	<i>Rhizobium leguminosarum</i> IA (Ia)	LMG 14904 T	14		401 248 (для Ia)	1%	KC462497 (<i>R. leguminosarum</i> FA-4)
7	<i>Rhizobium leguminosarum</i> Ib	FK-4	6		470	0%	KC462495
8	<i>Rhizobium leguminosarum</i> IIC (= <i>Rhizobium ecuadorensis</i>)	CNPSo 671 T	5		538	6%	NZ_LFIO00000000
9	<i>Rhizobium leguminosarum</i> IIID (IIId)	FN-6	6		397 249 (для IIId)	0%	KC462501
10	<i>Rhizobium phaseoli</i>	ATCC14482 T	3		524	11%	NZ_RJVV00000000

Анализ микросимбионтов фасоли на основе родоспецифичного маркера *hin*-регион позволил уточнить таксономическое положение штаммов и определить внутривидовое разнообразие. Выборка фасолевых штаммов по данному хромосомному маркеру была разделена на 6 генотипов в рамках выявленных ранее видов *Rhizobium leguminosarum* (IA, IB, IC, IID), *Rhizobium phaseoli* и *Pararhizobium giardinii*.

В таблице 2 представлена структура *hin*-региона у исследуемых штаммов и штаммов-микросимбионтов фасоли, полные геномы которых выложены в открытых базах данных. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей данного маркера выявил 23 генотипа ризобий, выделенных из клубеньков фасоли.

Наиболее полиморфной на внутривидовом уровне является группа штаммов, которая принадлежит к генотипу *R. phaseoli*, сходство составило ≥ 89 %. На межвидовом уровне наиболее отдаленными от всех симбионтов фасоли оказались генотипы *R. mesoamericanicum* и *R. tibeticum*.

Нуклеотидная последовательность типового штамма *R. ecuadorensis* CNPSo 671 T имеет сходство 94 % с *hin*-регионом генотипа *R. leguminosarum* IC. Таким образом, штаммы этой группы можно уверенно отнести к виду *R. ecuadorensis*. При этом они отличаются вставкой в 117 п.о. в промотерной области второй копии гена тРНК-Глу (СТС).

В результате проведенных работ в качестве экспресс-методики определения генотипов ризобий или КлОЕ, образующих клубеньки на корнях фасоли, предлагаем использовать методику *hin*-регион ПЦР, позволяющую проводить дифференциацию штаммов на уровне вида. В качестве дополнительного подтверждающего метода возможно применение фингерпринтинга saAFLP для выявления групп штаммов.

Клубеньковые бактерии – симбионты сои (*Glycine max*). Типичными микросимбионтами культурной сои в почвах выступают медленнорастущие ризобии видов *B. japonicum* и *B. diazoefficiens*. Взаимодействие местных ризобий сои между собой, а также с интродуцированными штаммами, может приводить к возникновению новых генотипов микросимбионтов, которые обуславливают гетерогенность популяций этих микроорганизмов, что в свою очередь влияет как на эффективность бобово-ризобиальных симбиозов, так и на плодородие почвы в целом. В настоящее время известны следующие брадиризобиальные микросимбионты сои: *B. japonicum*, *B. diazoefficiens*, *B. huanghuaihaiense*, *B. liaoningense*, *B. daqingense*, *B. ottawaense*, *B. elkanii*.

С целью подтверждения таксономического положения исследуемых штаммов было проведено генотипирование соевых микросимбионтов по хромосомным маркерам – генам 16S рРНК и *rpoB*. Выборка штаммов была разделена на три вида: *B. japonicum* (USDA 123, USDA 6), *B. diazoefficiens* (USDA 110) и *B. ottawaense* (USDA 4). Группа штаммов USDA 123 – интенсивно растущие ризобии и наиболее часто встречающиеся в почвах регионов культивирования сои; группы USDA 6 T, USDA 4 и USDA 110 – группы медленнорастущих штаммов.

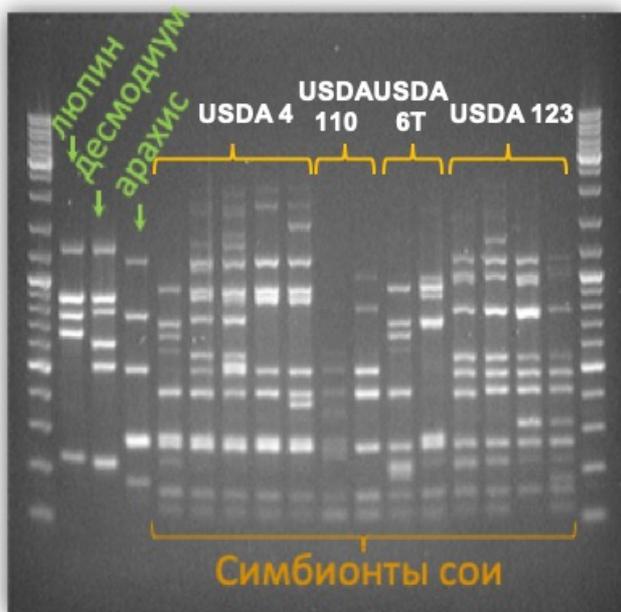


Рисунок 3. saAFLP анализ с использованием эндонуклеазы рестрикции *Xba*II.

Для анализа внутривидового полиморфизма было проведено секвенирование межгенного региона 16-23S рРНК (ITS). В результате штаммы вида *B. japonicum* были дифференцированы по группам USDA 123 и USDA 6. При этом 2 изолята из клубеньков люпина и десмодиума образовали референсную группу, а изолят Nuri 16 из клубеньков арахиса попал в группу USDA 4 (*B. ottawaense*) и оказался филогенетически ближе к симбионтам сои.

С помощью метода saAFLP была проведена оценка генетического разнообразия *Bradyrhizobium* sp. на внутривидовом уровне и выявлено 13 генотипов симбионтов сои и 3 генотипа референсных штаммов – симбионтов арахиса, десмодиума и люпина (рис. 3).

Таким образом, с использованием данной техники удалось выявить штаммовые различия как внутри группы быстрорастущих штаммов, так и между медленно растущими штаммами.

Уровень нуклеотидного полиморфизма маркеров ризобий симбионтов фасоли, сои и растений ГПИ трибы *Viciae*. С помощью программного продукта DNAsp 5.10 для клубеньковых бактерий по каждому маркеру было определено нуклеотидное разнообразие (вычисляемое как среднее число нуклеотидных различий на сайт между двумя последовательностями и его дисперсия выборки), и количество полиморфных сайтов (табл. 3).

Таблица 3. Уровень нуклеотидного полиморфизма маркеров.

Род	Генетический маркер	Нуклеотидное разнообразие, Pi	Количество полиморфных сайтов, S	
<i>Rhizobium</i> sp.	16S рРНК (1317 п.о.)	0,01234	120	
	<i>rpoB</i> (934 п.о.)	0,06292	312	
	Sym-гены: bv. phaseoli	<i>nodC</i> (804 п.о.)	0,13566	364
		<i>nifH</i> (407 п.о.)	0,04675	97
		<i>nodD</i> (867 п.о.)	0,03434	96
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	16S рРНК (1444 п.о.)	0,00509	48	
	<i>rpoB</i> (940 п.о.)	0,03768	131	
	16-23S рРНК (ITS) (916 п.о.)	0,04364	133	
	Sym-гены:	<i>nodC</i> (780 п.о.)	0,03822	287
		<i>nifH</i> (702 п.о.)	0,01329	94

Были использованы нуклеотидные последовательности хромосомных маркеров, генов *16S* рРНК и *rpoB* всех штаммов – микросимбионтов фасоли обыкновенной, гороха, бобов и сои, а также типовые штаммы различных видов *Rhizobium* sp. и *Bradyrhizobium* sp. Известно, что вследствие низкой разрешающей способности, частых рекомбинационных событий и горизонтального переноса, ген *16S* рРНК не может быть применен для достоверного определения филогенетической структуры рода *Rhizobium* на видовом уровне. Белок-кодирующий ген *rpoB* характеризуется большим количеством полиморфных сайтов и позволяет разделять штаммы на уровне вида. Генотипирование выборки микросимбионтов сои на основе хромосомных маркеров *rpoB* и межгенного региона 16-23S рРНК позволило разделить штаммы на уровне вида.

Ген *nodC*, наряду с другими генами нодуляции, причислен к «общим генам клубенькообразования». Ввиду того, что симбиотические гены у бактерий рода *Rhizobium* sp. локализованы на плазмиде, этот маркер часто используется исследователями для изучения генетики специфичности бобово-ризобияльного симбиоза [Тихонович с соавт., 2009], а наличие у всех видов *Rhizobium* sp. только одной копии гена *nodC* позволяет изучать эволюцию *sym*-плазмид. В рамках проведенных работ, уровень нуклеотидного полиморфизма данного симбиотического маркера у бактерий рода *Rhizobium* sp. (микросимбионтов фасоли, гороха и бобов) выше, чем у хромосомных генов.

Несмотря на высокий уровень полиморфизма симбиотических маркеров бактерий рода *Bradyrhizobium* sp., использование их для дифференциации симбиоваров микросимбионтов сои ограничено. Это обусловлено частыми явлениями горизонтального переноса пула симбиотических генов между генетически удаленными штаммами.

Вегетационные испытания на растениях *Pisum sativum* и *Vicia faba*. Ранее нами на растениях гороха в условиях лабораторного опыта был выявлен различный морфогенез клубеньков, при котором инокуляция растений штаммами IA-генотипа способствовала образованию нормальных палочковидных клубеньков, а в случае обработки ризобиями IB-генотипа – приводила к появлению “химерных” клубеньков бобово-горохового типа (рис. 4).

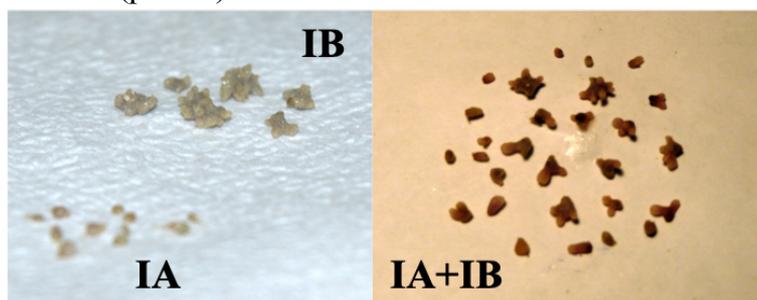


Рисунок 4. Морфотипы клубеньков на корнях гороха.

На 9 сортах гороха был проведен лабораторный опыт с предпосевной инокуляцией семян смесью штаммов *R. leguminosarum* различных генотипов в качестве положительного контроля, а также вариант опыта без обработки. Были проанализированы высота и вес наземной части растений, а также проведено генотипирование КлОЕ в клубеньках. По результатам лабораторного опыта выявлено, что применение предпосевной обработки семян суспензией ризобияльных

культур приводит к значительному увеличению высоты и веса наземной части растений по сравнению с вариантом опыта без обработки.

Для последующего генотипирования ризобий, образовавших клубеньки в варианте опыте K+ (в отрицательном контроле клубеньков не обнаружено), с каждого сорта были отобраны 12 клубеньков. По результатам *hin*-регион ПЦР все КлОЕ были представлены генотипом, схожим с генотипом HF штамма *R. leguminosarum* Ls8 (1300 п.о.). Ввиду того, что данный генотип не был выявлен ранее, как специфичный при симбиотических взаимодействиях с горохом, столь тотальная представленность его в клубеньках на корнях всех 9 сортов гороха вызвала большой интерес к данному штамму. В результате было решено провести полногеномное секвенирование этого штамма с последующим сравнением с гороховым микросимбионтом - *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841, генотип IB [Young et al., 2006].

В результате секвенирования и анализа аннотаций было выявлено, что оба штамма имеют сходные значения в структуре генома. Содержание GC-оснований соответствует значениям, представленным для геномов других штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae* в базе данных NCBI / Genome.

Для оценки полиморфизма были проанализированы последовательности генов *rpoB* и *nodD*. При сравнительной оценке нуклеотидных последовательностей симбиотического маркера исследуемый изолят Ls8 оказался наиболее близок к типовому штамму *Rhizobium pisi* DSM 30132 T генотипа *sym-1*, характерного для симбионтов гороха. По результатам сравнительной оценки нуклеотидных последовательностей хромосомного маркера *rpoB* изолят Ls8 образует монофилетичную группу вместе с типовым штаммом *R. laguerreae* FB206 T и *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841.

Вегетационные испытания на *Phaseolus vulgaris* (фасоль обыкновенная). В рамках вегетационных испытаний был проведен лабораторный опыт на фасоли обыкновенной следующих сортов и сортообразцов: 09-180; 09-147; 08-543; 05-82; Шоколадница; Стрела; Пинто. В качестве инокулята были использованы суспензии монокультур ризобиальных штаммов, а также смесь всех штаммов в качестве положительного контроля и вариант без обработки.

Было выявлено, что инокуляция определенными штаммами (генотипами) приводила к уменьшению массы надземной части растений; обработка некоторыми штаммами была нейтральной по влиянию на данный показатель; но были и те штаммы (генотипы), которые оказывали явно выраженный эффект на прирост зелёной массы, что свидетельствует о сорт-штаммовой специфичности данных растительно-микробных взаимодействий.

Практически на всех исследуемых сортах вариант опыта K+ показал максимальные значения по количеству образовавшихся клубеньков и по массе наземной части растений, проявляя тем самым синергетический эффект, что является косвенным признаком эффективности симбиоза. Сортообразцы 05-82, 08-543, 09-147, 09-180 оказались менее отзывчивыми на инокуляцию, в случае с моноинокуляцией некоторыми из используемых штаммов клубеньков образовано не было.

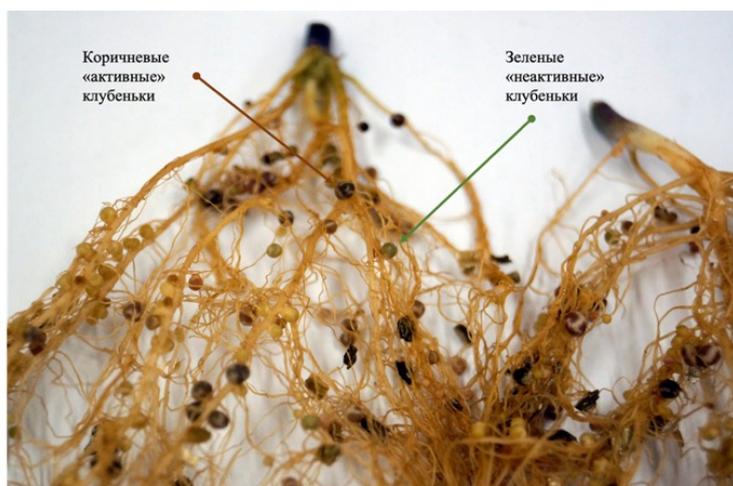


Рисунок 5. Фотография корней фасоли сортообразца 09-180 в варианте опыта с положительным контролем.

В случае с положительным контролем на всех сортах было выявлено отличие в морфотипе образовавшихся клубеньков: большие, коричневые «активные» клубеньки и маленькие, зеленые «неактивные» клубеньки (рис. 5). Последующее генотипирование КлОЕ проводили с учетом этих отличий. С каждого сорта с 3-х растений варианта опыта К+ были собраны клубеньки.

Идентификацию штамма, образовавшего клубенек, проводили с помощью *hin*-регион

ПЦР и *rpoB*-RFLP анализа (табл. 4).

Таблица 4. Генотипы КлОЕ в опыте с положительным контролем.

Вариант опыта	<i>rpoB</i> -RFLP профиль	Сорта и сортообразцы						
		09-180	09-147	08-543	05-82	Шоколадница	Стрела	Пинто
<i>R. leguminosarum</i> I/A	1	8,4%	8,4%	-	25,1%	8,4%	-	16,7%
<i>R. leguminosarum</i> I/b	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> II/C	4	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> III/d	1	-	8,4%	-	16,6%	16,6%	49,9%	16,7%
<i>P. giardinii</i>	2	33,3%	16,7%	41,7%	41,7%	41,7%	8,4%	16,7%
<i>R. phaseoli</i>	3	58,3%	66,5%	58,3%	16,6%	33,3%	41,7%	49,9%

Зеленые клубеньки были образованы *hin*-генотипами *P. giardinii* и *R. leguminosarum* III D (2 группа по *rpoB*-RFLP), а коричневые – *R. leguminosarum* IA и *R. phaseoli* генотипами (1 и 3 группы по *rpoB*-RFLP), что в свою очередь подтверждает ранее полученные данные об преобладании IA-генотипа в активных клубеньках на корнях фасоли как в лабораторном, так и в полевом опытах. Образование «неактивных» зеленых клубеньков штаммами ризобий с генотипом *P. giardinii* также подтверждает данные о том, что этот вид изначально описан, как не эффективный на *Phaseolus vulgaris* [Amarger et al., 1997]. В результате проведенного опыта был сделан вывод о возможной сортоспецифичности бобово-ризобиальных взаимодействий и выявлении конкретного генотипа, образовавшего большинство клубеньков на корнях растений каждого сорта. А именно, генотип *R. phaseoli* на сорте Стрела, Пинто, сортообразцах 08-543, 09-147, 09-180.

Вегетационные испытания на сое (*Glycine max*). В рамках лабораторного опыта были проведены испытания на 4 сортах сои (Магева, Чера-1, MON-23, Semu 315); в качестве инокулятов использовались суспензии монокультур штаммов *Bradyrhizobium* sp., а также смесь всех штаммов в качестве положительного контроля и вариант без обработки.

При анализе веса наземной части растений было выявлено, что растения сорта MON-23 и Чера-1 не отличались по данному признаку при разной микробной обработке. Растения сорта Semu-315 набрали больше зеленой массы при совместной инокуляции в варианте опыта К+, а сорт Магева – при инокуляции штаммом GS-4 и штаммами в варианте опыта К+.

По количеству клубеньков откликнулись на инокуляцию смесью штаммов растения сортов Semu-315 и Магева; на корнях растений сорта MON-23 было выявлено большее количество клубеньков при обработке штаммом M-8 (USDA 4); растения сорта Чера-1 не показали статистически различимых значений по данному показателю.

С растений каждого сорта в варианте опыта К+ были отобраны по 10 клубеньков для дальнейшего генотипирования и определения штаммов ризобий, образовавших клубеньки. На выделенной тотальной ДНК клубенька была проведена saAFLP с применением эндонуклеазы рестрикции *Xma*I.

Таблица 5. Генотипы КлОЕ в опыте с положительным контролем.

№	Состав инокулята / сорт сои	Магева	Чера-1	MON-23	Semu 315
1	<i>B. diazoefficiens</i> GS-4 (USDA 110)	70%	50%	20%	100%
2	<i>B. ottawaense</i> M-8 (USDA 4)	30%	50%	80%	-
3	<i>B. japonicum</i> 46-2 (USDA 6)	-	-	-	-

При сравнении полученных профилей с профилями штаммов-инокулятов (табл. 5), было выявлено, что клубеньки образованы штаммами GS-4 и M-8 с различным процентным соотношением:

- штаммом GS-4 были образованы все клубеньки на растениях сорта Semu-315 и 70% клубеньков на растениях сорта Магева; данный штамм присутствовал и в клубеньках двух других сортов, но в меньшинстве;
- штаммом M-8 образовано 80% клубеньков на растениях сорта MON-23 и 50 % на растениях сорта Чера-1.

Из вышесказанного можно сделать предположение о выявленной сортовой специфичности, а именно у сортов Semu-315 и Магева к штаммам группы USDA 110, а также у сорта MON-23 к штаммам группы USDA 4.

Изучение эффективности действия и стабильности состава консорциумов полезных микроорганизмов (во времени). В 2008 г. Трефилова Л.В. представила диссертационную работу, показывающую перспективность и эффективность использования цианобактерий в агробиотехнологии. Дидович С.В. с соавт. в ходе многолетних экспериментов было установлено, что применение цианобактериальных ассоциаций способствует максимальной реализации потенциала растительно-микробного взаимодействия в агроценозах, повышая биологическую активность в почве, урожайность зернобобовых культур, улучшая качество зерна [Дидович с соавт., 2016].

Для анализа влияния микроводорослей на функционал и стабильность монокомпонентного биопрепарата на основе эффективных ризобиальных штаммов был спланирован вегетационный опыт с использованием микроводорослей *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 и *Nostoc linckia* CCM 144.

В рамках вегетационного опыта семена фасоли сорта «Стрела» были обработаны различными микробными препаратами с разным временем хранения согласно схеме опыта (табл. 6). Инокуляты хранили в темном и сухом месте. Через

3 недели после посадки проводилась оценка количества образованных на корнях клубеньков и распределения *hin*-генотипов КЛОЕ.

Таблица 6. Схема вегетационного опыта на фасоли сорта «Стрела».

Вариант опыта	Инокулят
Отрицательный контроль (К-)	Без обработки
Положительный контроль (К+)	<i>R. leguminosarum</i> (FA-4; 105); <i>P. giardinii</i> Pv8e
Водорослевый биопрепарат №1 - ЦБК	<i>Nostoc linckia</i> CCM 144 + <i>R. leguminosarum</i> (FA-4; 105); <i>P. giardinii</i> Pv8e
Водорослевый биопрепарат №2 - хлорелла	<i>Chlorella vulgaris</i> IPPAS C-1 + <i>R. leguminosarum</i> (FA-4; 105); <i>P. giardinii</i> Pv8e

Анализ проводился последовательно по достижении пяти временных точек от начала эксперимента: 1 ВТ (23 апреля 2018 г.) – 0 сут.; 2 ВТ (24 мая 2018 г.) – 30 сут.; 3 ВТ (04 июня 2018 г.) – 45 сут.; 4 ВТ (24 июля 2018 г.) – 90 сут.; 5 ВТ (19 октября 2018 г.) – 180 сут.

В результате по физиологическим параметрам растений фасоли было выявлено, что удельное количество клубеньков в течение первых 30 сут. хранения стабильно либо повышается; после 45 сут. и до 180 сут. – падает; а по истечении полугода – восстанавливается.

Определение генотипа КЛОЕ проводили с помощью *hin*-регион ПЦР. Из 10 клубеньков в каждом варианте опыта и временной точке была выделена тотальная ДНК. В результате было определено, что клубеньки были образованы генотипами штаммов FA-4 (*R. leguminosarum* IA) и Pv8e (*P. giardinii*).

Было выявлено, что водорослевые биопрепараты приводят к изменению генотипа ризобий, образовавших большинство клубеньков, по сравнению с положительным контролем. Предположительно это может быть связано с присутствием различных бактериальных спутников у микроводорослевых ассоциаций, что может смещать микробное равновесие.

Для оценки качественного соотношения таксонов в водорослевых биопрепаратах для каждой временной точки инокуляты подвергались метагеномному секвенированию по хромосомному маркеру 16S рРНК.

По результатам метагеномного секвенирования было выявлено, что к 30 сут. хранения препарата на основе *Nostoc linckia* CCM 144 количество бактерий рода *Rhizobium* сократилось вдвое. Однако именно после инокуляции растений биопрепаратом с данным сроком хранения было получено заметное увеличение количества клубеньков (рис. 6).

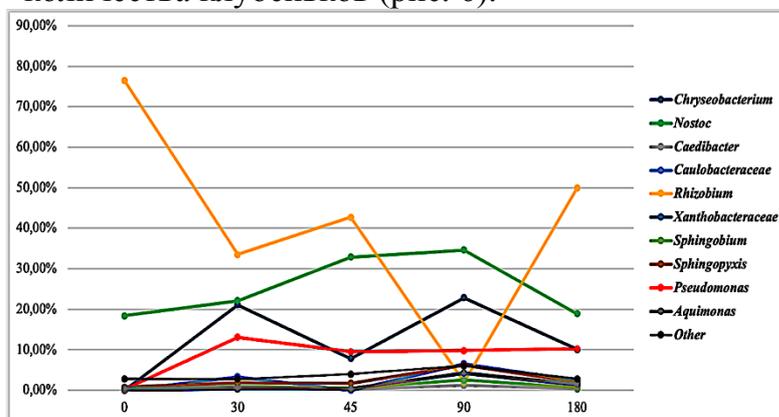


Рисунок 6. Компонентный состав комплексного микробного биопрепарата на основе *Nostoc linckia* CCM 144 в процессе хранения.

Содержание цианобактерии *Nostoc* к 90 сут. хранения увеличивалось примерно в 2 раза, а содержание ризобий падало до 0, соответственно, при инокуляции растений биопрепаратами со сроком хранения 3 мес. клубеньков практически не образовывалось. Интересно, что уменьшение содержания ризобий на 30 сут. и 90 сут.

хранения коррелирует с увеличением количества ДНК-матриц бактерий семейства Xanthobacteraceae.

К 6 мес. хранения соотношение бактериальных таксонов в биопрепарате на основе *Nostoc linckia* ССМ 144 отличалось от первоначального состава наличием бактерий рода *Pseudomonas* (10 %) и семейства Xanthobacteraceae (10 %), доля ризобий уменьшилась до 50 %; доля цианобактерий *Nostoc* осталась такой же.

У биопрепарата на основе *Chlorella vulgaris* после 30 сут. хранения также резко

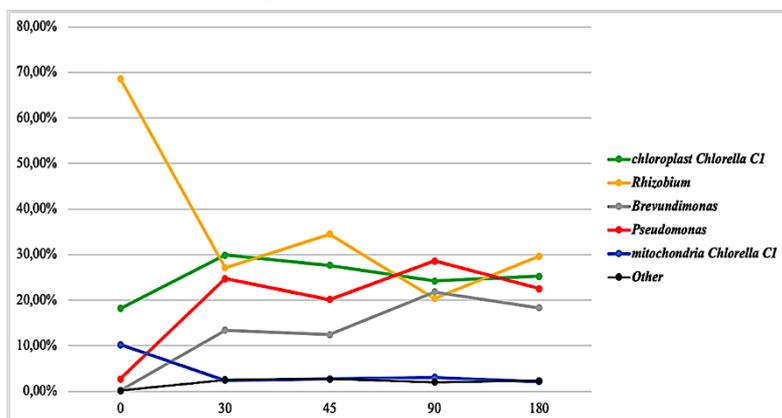


Рисунок 7. Компонентный состав комплексного микробного биопрепарата на основе *Chlorella vulgaris* C1 в процессе хранения.

уменьшалась доля бактерий рода *Rhizobium*, а доля *Chlorella*, *Pseudomonas* и *Brevundimonas* возрастала (рис. 7). Интересно, что к 3 мес. хранения происходит стабилизация состава биопрепарата, и доля всех основных выявленных таксонов колеблется между 20-30 %. Также выявлена корреляция между падением числа ризобиальных матриц и ростом числа матриц

бактерий *Pseudomonas* на 30 сут. и 90 сут. хранения биопрепарата.

Специфичность симбиотических взаимодействий бактерий рода *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* с растениями трибы *Viciae*. В рамках полевого испытания в качестве инокулятов были использованы производственные штаммы с 4 различными комбинациями генотипов. Исходно эти штаммы выделены из активных клубеньков гороха и бобов и идентифицированы как *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Были использованы семена бобовых растений ГПИ: гороха (сорт Девиз), чечевицы (сорт Линза), чины (сорт Сподиванка) и бобов (сорт Билун). Полевой опыт с совместным посевом семян гороха, кормовых бобов, чины, чечевицы проводили в 2016 г. на площади опытного участка (10 м²) на дерново-подзолистых почвах с пахотным горизонтом 20 см (Московская область, Россия).

Дальнейшее генотипирование КЛОЕ проводили путем анализа последовательностей хромосомных маркеров (фрагмента гена *rpoB* и *hin*-региона) и рестрикционного анализа плазмидного маркера – фрагмента гена ризобиального симбиотического транскрипционного регулятора - *nodD*.

Для определения *sym*-генотипа был использован метод рестрикционного анализа *nodD*-гена с применением *MspI*-рестриктазы. По результатам электрофоретического разделения продуктов рестрикции для всех четырех растений группы перекрестной инокуляции было выявлено 4 *sym*-генотипа.

В клубеньках всех опытных растений доминировал 4 *sym*-генотип ризобий (51 %), характерный для штаммов-инокулятов *Rlv* Y-2 и *Rlv* B-25. У менее четверти клубеньков был выявлен первый *sym*-генотип ризобий (13 %), характерный для штаммов-инокулятов *Rlv* 65 и *Rlv* Y-7. Остальные 36 % КЛОЕ были представлены вторым и третьим *sym*-генотипами аборигенных штаммов ризобий. Кроме того, выявлена явная специфичность ризобий с четвертым *sym*-генотипом – симбионтов *Vicia faba* L. (96 % КЛОЕ), и ризобий со вторым *sym*-генотипом – симбионтов *Pisum*

sativum L (54 %). У симбионтов чины и чечевицы также преобладал четвертый *sym*-генотип.

Для достоверной оценки нодуляционной конкурентоспособности производственных штаммов на фоне аборигенных клубеньковых бактерий был проведен анализ внутривидового разнообразия КлОЕ при помощи метода *hin*-регион фингерпринтинга. Было выявлено 4 генетических профиля: IA, IB, Ia и новый профиль – HF /Heavy Fragment/. Для симбионтов *V. faba* характерны Ia и IB *hin*-генотипы, для *P. sativum* - IA-генотип ризобий. Интересно, что новый генотип HF удалось обнаружить только при использовании тотальной ДНК клубеньков, в то время как при работе с генетическим материалом чистых культур ризобий он не детектировался [Martens et al., 2008; Зотов с соавт., 2013].

Для растений *Vicia faba* оказалась характерной комбинация хромосомного маркера *hin*-регион Ia- и IB-генотипов с четвертым генотипом по симбиотическому маркеру - *nodD*-гену. Для растений *Pisum sativum* наблюдалась корреляция IA-генотипа со второй группой *sym*-генотипа. Структура *hin*-региона, а также комбинация этого маркера с *nodD*-геном, дают основание предположить, что вышеупомянутый генотип HF, возможно, возникает в случае, когда штамм, образующий клубенек у растений ГПИ, в своем составе несет «неподходящую» для данного растения (*sym*-1 и *sym*-3) плазмиду.

Таким образом, было установлено, что только 48 % клубеньков были образованы штаммами, генотипы которых схожи с таковыми у штаммов-инокулятов, главным образом *Rlv* Y-2 (Ia-генотип и *sym*-4) – 31 % и *Rlv* B-25 (IB-генотип и *sym*-4) – 15 %. Также было показано, что генотип активного (Nod+) штамма-инокулята *Rlv* Y-7 (IA и *sym*-1) в данном опыте клубеньков не образовал ни на одном растении ГПИ, соответственно, не может рассматриваться в качестве перспективного производственного инокулята под данную культуру.

Эффективность взаимодействия растений фасоли с ризобиями различных генотипов. На фасоли сорта Рубин в Московской области были проведены мелкоделяночные полевые испытания для оценки эффективности предпосевной инокуляции типовыми клубеньковыми бактериями различных генотипов в сравнении с контролем без микробной обработки.

Предпосевная микробная инокуляция во всех вариантах приводила к увеличению всхожести растений фасоли относительно контроля без обработки. Обработка штаммами ризобий видов *E. fredii* и *R. lusitanum* приводила к значительному уменьшению как общей, так и удельной урожайности семян. В



Рисунок 8. Расщепление морфотипов семян фасоли сорта «Рубин» по цвету и форме в полевом опыте при различной предпосевной обработке микробными препаратами.

варианте со штаммом *R. leucaenae* LMG 9517T достоверных отличий в урожайности данного сорта фасоли выявлено не было, в то время как обработка штаммами видов *R. etli* и *R. tropici* type B привела к существенным прибавкам урожайности – 42 % и 22 %, соответственно. Штамм *R. etli* DSM 11541T показал лучшие

результаты и по удельной и по общей урожайности фасоли сорта Рубин.

При анализе результатов данного опыта впервые было выявлено расщепление морфотипа семян фасоли по цвету и форме (рис. 8). При этом степень этого расщепления в разных опытах неодинакова: от практически полного отсутствия (Контроль-, *Ensifer fredii* DSM 5851T, *R. lusitanum* LMG 22705T) до максимального проявления нехарактерного для сорта «коричневого» морфотипа по весу - 31,5 % в варианте *R. etli* DSM 11541T.

Так как, за исключением вида предпосевной обработки семян, остальные факторы были одинаковыми, то можно выдвинуть гипотезу, что выявленная фенотипическая изменчивость связана с генотипами клубеньковых бактерий, вступающих с фасолью в симбиоз и/или оказывающих ассоциативный эффект на растение. Стоит отметить, что селекция сорта Рубин проводилась в почвах центральной части России на фоне доминирующего вида *R. leguminosarum* (условия варианта опыта без обработки), а все штаммы-инокуляты изначально выделены в Латинской Америке и не встречаются в опытных почвах. Вероятно, этим может объясняться эффект расщепления морфотипов фасоли, не проявлявшийся ранее в ходе селекционных работ.

Также в данном опыте наблюдалась изменчивость по интегральному показателю урожайности культуры: три вида ризобий приводили к уменьшению урожайности, несмотря на большую всхожесть семян (*Ensifer fredii*, *R. lusitanum*, *R. leucaenae*), три вида стимулировали увеличение урожайности (*R. mesoamericanum*, *R. tropici* B, *R. etli*). В итоге: штамм-инокулят вида *R. etli* оказался лидером по общей (42 %), в т.ч. удельной урожайности на 26 % относительно контроля, оказав также благотворное влияние на всхожесть.

Содержание белка было определено для каждого опыта с учетом расщепления морфопризнаков. «Коричневые» зерна содержали значительно меньше белка, чем «розовые», а максимальная прибавка относительно контроля по данному параметру выявлена в опытах с обработкой штаммами *R. lusitanum* LMG 22705T и *R. leucaenae* LMG 9517T. Несмотря на такие разительные отличия по всем показателям в данном опыте, проведенное генотипирование КлОЕ показало, что во всех случаях клубеньки были образованы близкородственными штаммами I/A *hin*-генотипа; saAFLP (*ХтаЛ*) профили также подтвердили единообразие местной популяции.

Персонализированные формулы биопрепаратов на примере симбиоза с различными сортами сои. Схема проведенных полевых опытов предполагала сравнение влияния, выявленного в результате проведения лабораторных опытов, перспективного штамма *B. diazoefficiens* ССМ GS-4 с применяемыми техническими штаммами, показавшими лучшие результаты по исследуемым показателям при предыдущих селекциях на различных сортах сои.

В мелкоделяночном опыте были проведены испытания на производственных сортах российской селекции Зуша и Красивая Меча, в качестве инокулятов были использованы по 2 штамма из каждой генетически удаленной группы симбионтов сои. Отрицательным контролем служил вариант опыта без микробной обработки. В почве отсутствовали местные популяции клубеньковых бактерий сои, поэтому полученные данные являются следствием различной эффективности бобово-ризобиального симбиоза с интродуцированными штаммами.

Для последующей стадии полевых испытаний на сортах Зуша и Красивая Меча был отобран штамм *B. diazoefficiens* ССМ GS-4, образующий наибольшее количество активных клубеньков и производственные штаммы сравнения - *B.*

diazoefficiens 634b и *B. japonicum* 36. В результате проведенных полевых испытаний было показано, что перспективный штамм *B. diazoefficiens* ССМ GS-4 обеспечивает максимальную прибавку урожайности сортов Зуша и Красивая Меча – 3,5 ц/га (16,5 %) и 3,9 ц/га (18,4%) в сравнении с контролем, соответственно. При этом наблюдается повышение содержания белка в семенах сои сорта Зуша - на 1,2% и сорта Красивая Меча - на 1,4%. Следовательно, при обработке семян сои современных сортов отечественной селекции эффективность биоудобрений, полученных на основе указанного штамма *B. diazoefficiens* ССМ GS-4, превышала на 7,5-8% по показателю урожайности семян, а по содержанию сырого протеина в семенах - на 0,6-1,2% аналогичные показатели производственного штамма *B. japonicum* 634b.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования была впервые проведена сравнительная оценка структуры и полиморфизма родоспецифичного маркера *hin*-регион для всех известных на настоящее время микросимбионтов фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) и растений трибы *Viciae*. Высокий уровень полиморфизма и возможность разделять бактерии на уровне вида и группы штаммов (в совокупности с другими методиками) подтверждает перспективность использования данного маркера в бактериальной систематике и таксономии.

Были предложены экспресс методики идентификации и дифференциации ризобияльных культур, позволяющие изучать биоразнообразие микросимбионтов бобовых растений и выявлять специфичность растительно-микробных взаимодействий.

На примере растений трибы *Viciae* впервые была выявлена сцепленность хромосомного маркера *hin*-региона с плазмидным *nodD*-геном штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* в рамках исследуемой выборки. Анализ тотальной ДНК клубеньков с использованием *hin*-регион ПЦР для микросимбионтов растений *Pisum sativum* впервые был выявлен генотип - HF (Heavy Fragment), присутствующий у аборигенных ризобий, обладающих повышенной конкурентоспособностью.

В рамках полевых испытаний была показана фенотипическая изменчивость фасоли обыкновенной (расщепление морфотипа семян по цвету, форме и содержанию белка), вероятно связанная с генотипами интродуцированных штаммов клубеньковых бактерий, что в свою очередь принципиально влияет не только на количество, но и качество урожая данной культуры.

В результате проведенных работ в рамках настоящего исследования был предложен и научно обоснован способ повышения эффективности бобово-ризобияльного симбиоза посредством разработки персонализированных формул полифункциональных биопрепаратов.

ВЫВОДЫ:

1. Изучено биоразнообразие микросимбионтов сельскохозяйственно-значимых бобовых культур (фасоли, растений трибы *Viciae* (горох, бобы) и сои): выявлены генетически обособленные группы штаммов и предложены маркеры для экспресс-идентификации и дифференциации симбионтов данных растений, в том числе при определении клубенек-образующих единиц (КлОЕ).
2. Определен уровень внутри- и межвидового нуклеотидного полиморфизма микросимбионтов отдельных бобовых культур по каждому из маркеров, в т.ч. существенно расширена база данных по *hin*-региону и проведена ревизия таксономического положения исследуемых штаммов рода *Rhizobium*, что

подтверждает перспективность использования данного маркера в бактериальной систематике и таксономии.

3. По результатам проведенных лабораторных испытаний и определения генотипов клубенок-образующих единиц была выявлена сорт-штаммовая специфичность бобово-ризобиального симбиоза с потенциально различной эффективностью.
4. Показано, что использование микроводорослей и цианобактерий при создании консорциумов полезных микроорганизмов приводит к стабилизации состава комплексного биопрепарата (доля всех основных выявленных таксонов колеблется между 20-30%) уже после месяца хранения, однако при этом происходит смещение конкурентоспособности штаммов ризобий, образовавших большинство клубеньков, по сравнению с положительным контролем на основе чистых культур ризобий: от генотипа эффективного штамма *Rhizobium leguminosarum* IA к генотипу неэффективного штамма *Pararhizobium giardinii*.
5. В условиях полевого опыта была проверена гипотеза создания персонализированных формул биопрепаратов под бобовые культуры и было показано:
 - сцепленность хромосомного маркера *hin*-региона с RFLP-профилем симбиотического *nodD*-гена конкурентоспособных штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* - запатентован перспективный штамм для предпосевной обработки семян гороха (*Rhizobium leguminosarum* ССМ 32);
 - выявлено расщепление морфотипа семян фасоли по цвету и форме, вероятно связанное с генотипами интродуцированных штаммов клубеньковых бактерий, а также показана разная эффективность бобо-ризобиального симбиоза: от уменьшения (в случае генотипов *Ensifer fredii* и *Rhizobium lusitanum* – на 30%) до увеличения урожайности на 42 % (в случае генома *R. etli*) относительно контроля без обработки;
 - для сортов сои отечественной селекции Зуша и Красивая Меча была показана максимальная эффективность биоудобрений, полученных на основе штаммов генотипа USDA 110 - запатентован перспективный штамм для предпосевной обработки семян сои (*Bradyrhizobium diazoefficiens* ССМ GS-4).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ

Публикации в изданиях, входящих в базы Web of Science и Scopus:

1. Зотов В.С., Пунина Н.В., Хапчаева С.А., Дидович С.В., Мельничук Т.Н., Топунов А.Ф. Новый таксономический маркер клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* и его эволюция // Экологическая генетика. – СПб., 2012. – Т.10, № 2. – С.50-63. (ИФ РИНЦ 0,456, DOI: <http://dx.doi.org/10.17816/ecogen10250-63>). [Zotov V.S Punina N.V. Kharпчаeva S.A. Didovych S.V. Melnichuk T.N. Topunov A.F. A new taxonomic marker of nodule bacteria of the *Rhizobium* genus and its evolution. Russian Journal of Genetics: Applied Research. 2013; 3(2):102–113].

2. Хапчаева С.А., Дидович С.В., Топунов А.Ф., Мулюкин А.Л., Зотов В.С. Специфичность симбиотических взаимодействий бактерий рода *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* с растениями трибы *Viciaeae* // Экологическая генетика. – СПб., 2018. – Т.16, № 4. – С.51-60. (ИФ Scopus 0,117, DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen16451-60>).

Автор в следующих патентах:

3. Штамм *Rhizobium leguminosarum* ССМ 32 (ВКПМ В-12661) – ризобиальный компонент микробного биопрепарата для предпосевной обработки гороха. Дидович С.В., Зотов В.С., Хапчаева С.А., Топунов А.Ф. Дата приоритета – 20.01.2017г. Патент на изобретение № 2654578.

4. Штамм *Bradyrhizobium diazoefficiens* ССМ GS-4 (ВКПМ В-12660) – ризобиальный компонент микробного биопрепарата для предпосевной обработки сои. Дидович С.В., Зотов В.С., Хапчаева С.А., Топунов А.Ф. Дата приоритета – 20.01.2017г. Патент на изобретение № 2654580.

Публикации в изданиях, входящих в базу РИНЦ:

5. Зотов В.С., Пунина Н.В., Хапчаева С.А., Дидович С.В., Топунов А.Ф. Использование методов saAFLP и *hin*-регион ПЦР для генотипирования штаммов ризобий — симбионтов *Phaseolus vulgaris* // Таврический вестник аграрной науки. – 2013. – Т.1. – С.15-23.

6. Пунина Н.В., Макридакис Н.М., Хапчаева С.А., Дидович С.В., Топунов А.Ф. Применение молекулярных методов при создании растительных микробных препаратов // Таврический вестник аграрной науки. – 2016. – Т.5, №1. – С.20-35. (ИФ РИНЦ 0,343).

7. Дидович С.В., Москаленко С.В., Темралева А.Д., Хапчаева С.А. "Биотехнологический потенциал почвенных цианобактерий (обзор)" // Вопросы современной альгологии. – 2017. – Т.14, №2. (ИФ РИНЦ 0,096, URL: <http://algology.ru/1170>).

8. Пыркин В.О., Хапчаева С.А., Дидович С.В., Зотов В.С. Влияние комплексных биопрепаратов на почвенный микробиом // Таврический вестник аграрной науки. – 2018. – Т.14, №2. – С. 35-45. (ИФ РИНЦ 0,333, DOI: [10.25637/TVAN.2018.02.03](https://doi.org/10.25637/TVAN.2018.02.03)).

9. Хапчаева С.А., Зотов В.С., Дидович С.В., Топунов А.Ф. Маркирование микросимбионтов *Phaseolus vulgaris* и способы повышения эффективности бобово-ризобиального симбиоза // Таврический вестник аграрной науки. – 2018. – Т.16, №4. – С. 176-191. (ИФ РИНЦ 0,333, DOI: [10.25637/TVAN2018.04.16](https://doi.org/10.25637/TVAN2018.04.16)).

Прочие публикации:

10. Пунина Н.В., Зотов В.С., Хапчаева С.А. Молекулярные методы идентификации, оценки разнообразия и контроля полезных штаммов бактерий в агроценозах нута // Глава в методических рекомендациях «Экологически безопасная технология выращивания нута». Симферополь, 2014. С.13-17.

Тезисы в сборниках научных конференций, конгрессов и симпозиумов:

1. Хапчаева С.А., Пунина Н.В., Зотов В.С., Дидович С.В., Топунов А.Ф. 17-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушино (МО, Россия), 2013. Стр.53.

2. Khapchaeva S.A., Punina N.V., Zotov V.S., Didovich S.V., Topunov A.F. 12th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology (BAGECO12), Ljubljana (Slovenia), 2013. P.70.

3. Khapchaeva S.A., Punina N.V., Zotov V.S., Didovich S.V., Topunov A.F. 42nd Annual meeting ESNA - Perrotis College, Thessaloniki, ELLAS (Greece), 2013. PP.31.

4. Хапчаева С.А., Зотов В.С., Пунина Н.В., Топунов А.Ф., Дидович С.В. 18-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушино (МО, Россия), 2014. Стр. 229.

5. Khapchaeva S.A., Zotov V.S., Punina N.V., Didovich S.V., Topunov A.F. 43rd Annual meeting ESNA, Bolzano (Italy), 2014. P. 34.

6. Khapchaeva S.A., Zotov V.S., Punina N.V., Topunov A.F. 11th European Nitrogen Fixation Conference, Tenerife, Canary Islands (Spain), 2014. Стр. 343.

7. Didovich S.V., Khapchaeva S.A., Zotov V.S. 44th Annual meeting ESNA, Brno (Czech Republic), 2015. P.59-60.

8. Хапчаева С.А., Топунов А.Ф., Зотов В.С. III Международная научная конференция «Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки». Республика Крым (Россия), 2018. Стр. 54-56.