

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ФИЛОГЕНИЯ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КЛУБЕНЬКОВ РАСТЕНИЙ РОДА *Lupinaster*, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ НА ЮЖНОМ УРАЛЕ

© 2019 г. Ан. Х. Баймиев¹, *, Е. С. Акимова¹, Р. С. Гуменко¹,
А. А. Владимиров¹, А. А. Мулдашев², А. В. Чемерис¹, Ал. Х. Баймиев¹

¹Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

²Уфимский институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: baymiev@anrb.ru

Поступила в редакцию 29.01.2018 г.

После доработки 23.03.2018 г.

Принята к публикации 10.04.2018 г.

Исследовано генетическое разнообразие и филогения клубеньковых бактерий растений рода *Lupinaster* Adans.: *L. albus* Link и *L. pentaphyllus* Moench, и проведен анализ их симбиотических генов. По результатам исследований показано, что клубеньковые бактерии данных растений имеют определенные филогенетические различия, но тем не менее все близки к бактериям рода *Mesorhizobium*, за исключением одного обнаруженного штамма, который оказался филогенетически близок к бактериям рода *Rhizobium*. Анализ симбиотических генов (*nifH* и *nodC*) выявил высокую гомологию последовательностей данных генов у всех анализированных бактерий, независимо от их филогенетической принадлежности, и их филогенетическую близость с аналогичными генами, свойственными для бактерий рода *Mesorhizobium*. Вероятно, бактерии *Mesorhizobium* являются характерными для данных растений микросимбионтами, а обнаруженный штамм бактерии рода *Rhizobium* приобрел способность образовывать клубенек на корне растения *Lupinaster* за счет приобретения симбиотических генов в процессе горизонтального переноса генов. Выявленный нами генетический состав клубеньковых бактерий у изученных видов рода *Lupinaster* предоставляет еще один аргумент для подтверждения мнения, что они не являются представителями рода *Trifolium*

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, симбиотические гены, филогения, симбиоз, бобовые растения.

DOI: 10.1134/S0016675819010028

Бобово-ризобияльный симбиоз – уникальное природное явление, имеющее огромное экологическое значение. Бобовые растения за счет возможности усваивать в симбиозе с клубеньковыми бактериями атмосферный азот способны произрастать на участках с низким содержанием данного вещества и даже обогащать окружающую почву соединениями азота. Это, несомненно, имеет огромное значение для продуктивности окружающего эти растения ценоза.

Симбиотическое взаимодействие бобовых растений с клубеньковыми бактериями обладает высокой специфичностью. Для одних растений она менее выражена, особенно это касается тропических и субтропических бобовых растений, для других (бобовые растения умеренного климата) – весьма строгая.

Нами в этой работе был проведен анализ генетической гетерогенности и филогении клубеньковых бактерий, вступающих в симбиоз с двумя видами рода *Lupinaster* Adans. (люпинастер, или люпинник): *L. albus* Link (люпин белый) и *L. pentaphyllus* Moench (люпин обыкновенный, или пятилистный), произрастающими на территории Южного Урала. Интерес к этому роду, а также к микросимбионтам их видов возник вследствие того, что самостоятельность этого рода и его систематическое положение в течение продолжительного времени остается дискуссионным.

Хотя род *Lupinaster* был описан для науки еще в середине XVIII в., он долгое время не всегда признавался, особенно систематиками Старого Света. Он обычно включался в род *L. s. l.* (Клевер) в статусе какого-либо подродового подразделе-

ния, как это было сделано в фундаментальной сводке “Флора СССР” [1], что определило таксономическое положение видов этого рода на многие годы. Однако таксономические отличия *Lupinaster* были столь очевидны, что, в конце концов, большинство систематиков признали его родовую самостоятельность [2, 3]. Однако ряд флористов и сегодня продолжают рассматривать род *Trifolium* в широком смысле [4, 5]. Выявленные различия касались многих параметров: морфологии генеративной (цветки, плоды, соцветия) и вегетативной (листья) сферы, строения пыльцы, кариологии и пр. [3, 6]. Кроме того, велики различия и в распространении видов родов *Trifolium* s. str., и *Lupinaster*, что говорит о независимой эволюции этих родов. Если виды первого рода преимущественно распространены в странах Европы и Средиземноморья, то большинство видов второго произрастают в Северной Америке и лишь несколько видов в Сибири и Европе.

В настоящее время существуют также разногласия относительно родственных связей *Lupinaster* и его положения в системе бобовых. Чаще его относили и относят к трибе Trifolieae, однако при этом отмечали, что виды родства *Lupinaster* филогенетически более близки к преимущественно американскому роду *Lupinus* L. из трибы Genisteae, а не к другим подродовым подразделениям *Trifolium*. Вопрос о выделении новой трибы Lupineae [6], куда бы вошли *Lupinaster* и *Lupinus* с другими родственными родами, остается открытым.

Принадлежность исследуемых видов растений к роду *Trifolium* с большой долей вероятности предполагает образование азотфиксирующего симбиоза их с клубеньковыми бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* [7]. В случае же если это отдельный род в трибе Trifolieae, то скорее всего – с *Sinorhizobium* spp., поскольку растения остальных родов (*Trigonella* L., *Melilotus* Mill. и *Medicago* L.) преимущественно вступают в симбиоз с данным видом бактерий [8–10]. Единственными исключениями в этой симбиотической специфичности являются вид *Medicago ruthenica* (L.) Trautv., который вступает в симбиоз с *R. mongolense* [11], а также род *Ononis* L., представители которого взаимодействуют с большим числом штаммов [12, 13]. В этой связи исследование генетического разнообразия и филогении клубеньковых бактерий видов рода *Lupinaster* может пролить свет на его таксономическое положение и родственные связи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы и условия культивирования. Нами были использованы изоляты клубеньковых бактерий, выделенные из клубеньков растений *L. albus* и *L. pentaphyllus*, произрастающих на Южном Урале в районе Учалинского мелкосопочника. Бактерии из клубеньков изолировали

методом получения пункции из зоны размножения бактерий и рассевали ее на питательную агаризованную среду JM (0.1%-ный дрожжевой экстракт, 1%-ный маннит, 0.05% K_2HPO_4 , 0.05% $MgSO_4$, 0.01 NaCl, 1.5%-ный агар) до отдельных колоний [14]. Из каждого клубенька в работу брали по одному изоляту.

Выделение тотальной ДНК. ДНК из бактерий выделяли лизированием клеток в 1% Triton X100 и 1%-ной суспензии Chelex100. Для этого в 1.5-мл пробирки со 100 мкл 1% Triton X100 и 1%-ной суспензии Chelex100 помещали небольшое количество бактериальной массы и после суспензирования инкубировали при температуре 95°C 10 мин. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 12000 g в течение 3 мин. Надосадочную жидкость брали в качестве матрицы для ПЦР.

Генетический анализ штаммов. Генетическое разнообразие собранных штаммов исследовали с помощью RAPD-анализа (Random Amplified Polymorphic DNA) [15] с использованием следующих “случайных” праймеров: 1) 5'-gggcgctg-3'; 2) 5'-cagcccatc-3'; 3) 5'-gcgtccattc-3'.

ПЦР-ПДРФ-анализ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) [16] гена *16S* рРНК проводили с использованием мелкощепящих эндонуклеаз рестрикции *Kzo91* и *HaeIII*. Для амплификации гена *16S* рРНК были использованы универсальные праймеры fD1 5'-cccgggatccaagcttaaggaggtgatccagcc-3', rD1 5'-ccgaattcgtcgacaacaagattgtacctcgctcag-3', фланкирующие фрагмент гена размером около 1500 пн [17], для амплификации генов *recA* были использованы праймеры RecAF 5'-ggcagttcggcaagggtcgcgat-3' и RecAR 5'-atctggttgatgaagatcaccat-3', для амплификации генов *nifH* NifHF 5'-ttctatggaaagggcggttcggaagct-3' и NifHR 5'-atctcgccgacatgacgatataaatttc-3', для амплификации генов *nodC* NodCF 5'-cgtttcgtcttatcggtgctc-3' и NodCR 5'-cagctcgtctcgtattgat-3' [18].

Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3500 фирмы “Applied Biosystems, Inc.” (США) с использованием наборов “Big Dye Terminator v. 3.1”.

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакета компьютерных программ Lasergene фирмы “DNASTAR, Inc.” (США). Нуклеотидные последовательности для сравнительного анализа были взяты из базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Филогенетический анализ. Филогенетический анализ исследуемых штаммов осуществляли на основании данных множественного выравнивания (ClustalW) секвенированных фрагментов генов *16S* рРНК, *recA*, *nodC* и *nifH*. Построение филогенетических деревьев проводили с помощью программы Megalign из пакета программ Lasergene с использованием метода neighbor-joining (NEIGHBOR).

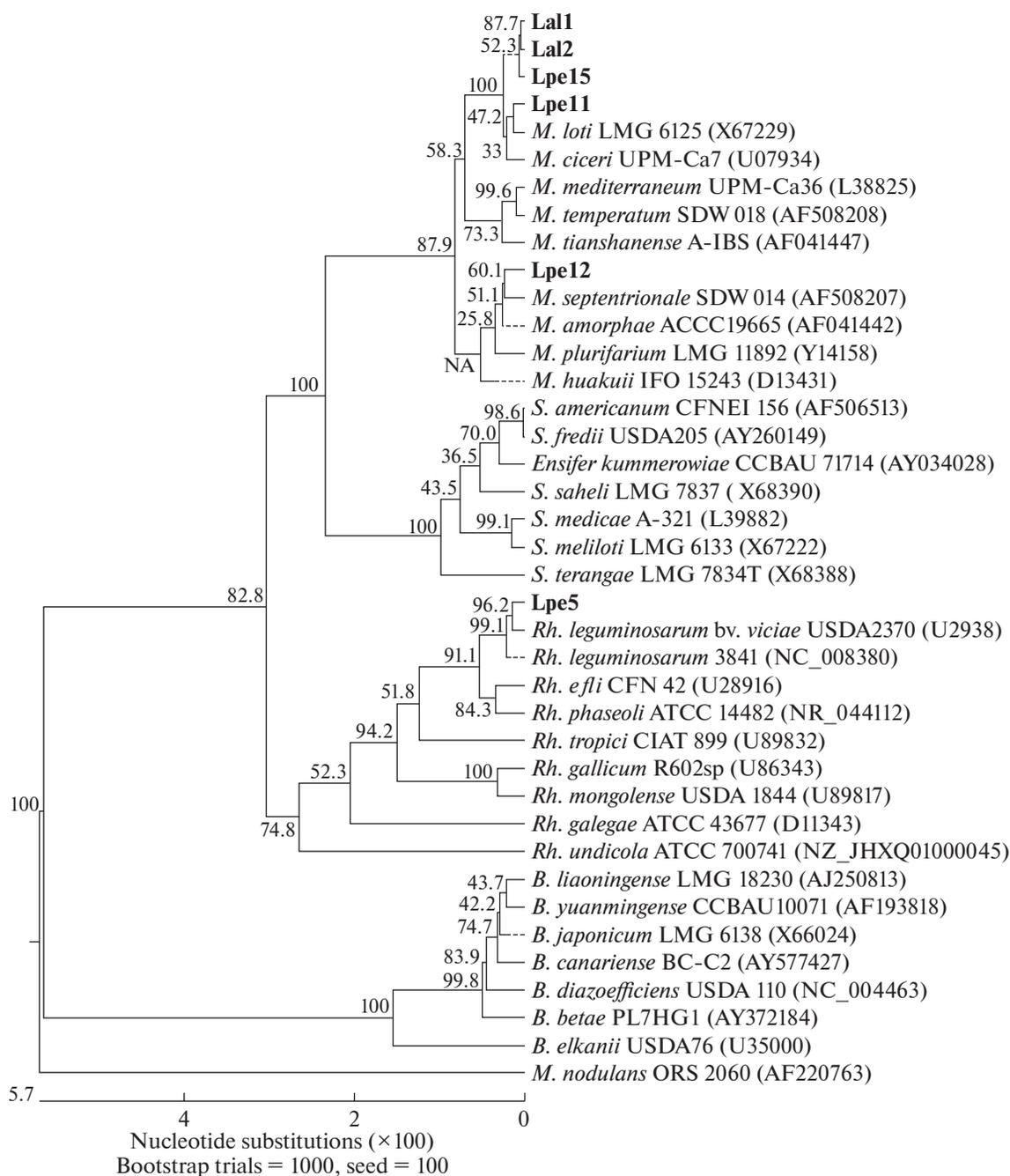


Рис. 1. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена *16S* рРНК. Полу жирным шрифтом отмечены исследованные нами штаммы микроорганизмов.

Статистическую достоверность ветвления (bootstrap-анализ) оценивали с использованием соответствующей функции программы Megalign на основе 1000 альтернативных деревьев.

Нуклеотидные последовательности гена *16S* рРНК, *recA*, *nodC* и *nifH* исследованных штаммов депонированы в Международном банке данных нуклеотидных последовательностей под номерами Ku725684–89, Ku702936–47, Ku672512–17.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У растений *Lupinaster albus* и *L. pentaphyllus*, произрастающих на территории Южного Урала, с корней были собраны клубеньки, из которых в дальнейшем были выделены 23 чистые культуры клубеньковых бактерий. Для проверки полиморфизма ДНК полученных культур был использован метод RAPD-анализа. В ходе исследования была обнаружена относительно высокая гетеро-

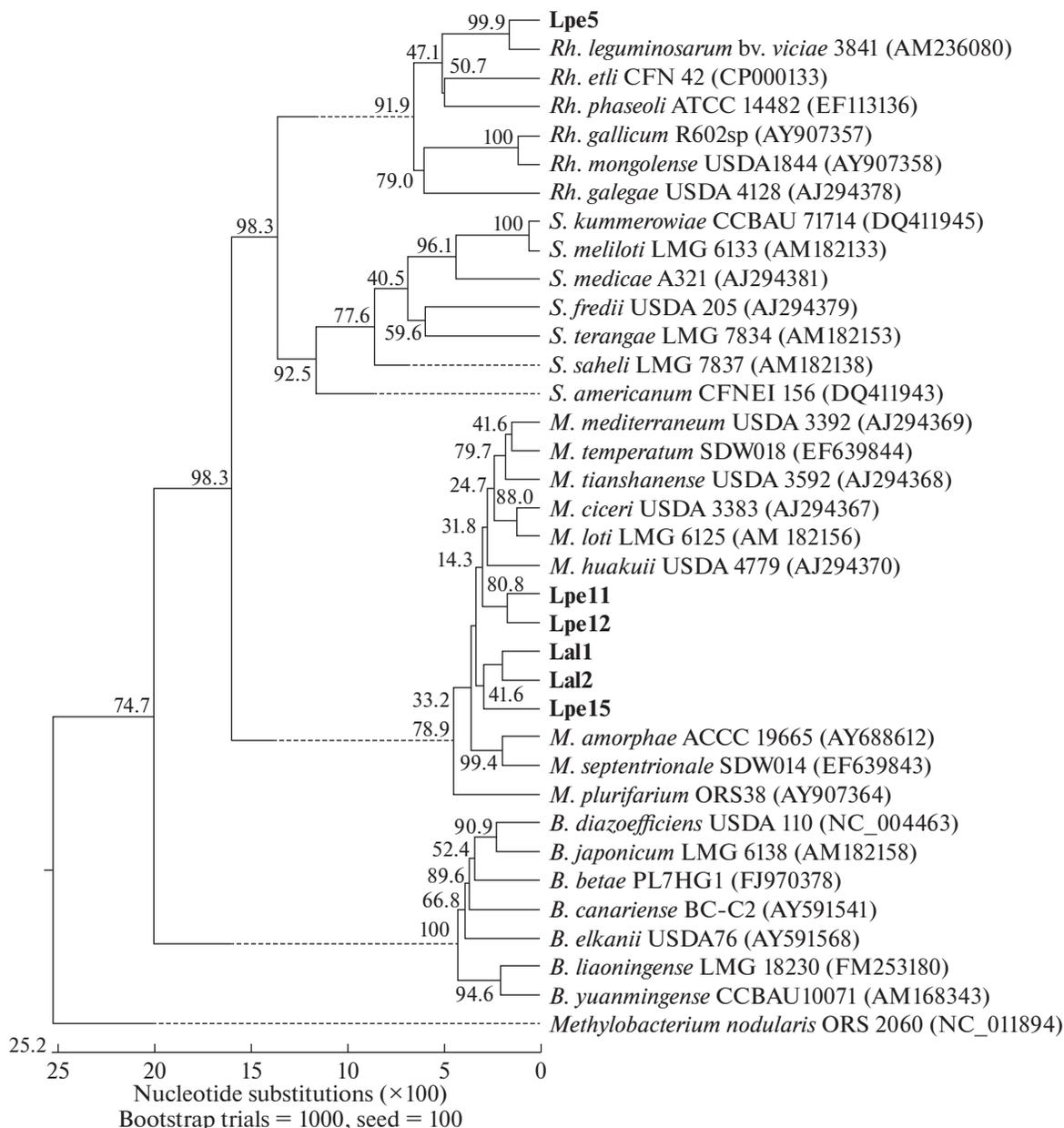


Рис. 2. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена *recA*. Полу жирным шрифтом отмечены исследованные нами штаммы микроорганизмов.

генность исследуемых образцов, которые формируют 11 групп генетически однородных изолятов (штаммов). Предварительный филогенетический анализ был проведен посредством 16S ПДРФ, в ходе которого было выявлено, что штаммы образуют шесть монофилетических групп. При этом некоторые группы состояли как из микросимбионтов *L. albus*, так и *L. pentaphyllus*. Вероятно, данные растения способны к заражению одними и теми же видами клубеньковых бактерий. Аббревиатурой Lal были обозначены штаммы, преимущественно обнаруживаемые в клубеньках *L. al-*

bus, а аббревиатурой Lpe штаммы – в клубеньках *L. pentaphyllus*.

С целью выявления филогенетической принадлежности представителей групп микроорганизмов было проведено определение нуклеотидной последовательности консервативных генов (*16S* рРНК и *recA*) и их сравнительный анализ с другими аналогичными генами, депонированными в GenBank. Основная часть бактерий оказалась близка к бактериям, принадлежащим к роду *Mesorhizobium*, по обоим исследованным генам (рис. 1, 2). Ис-

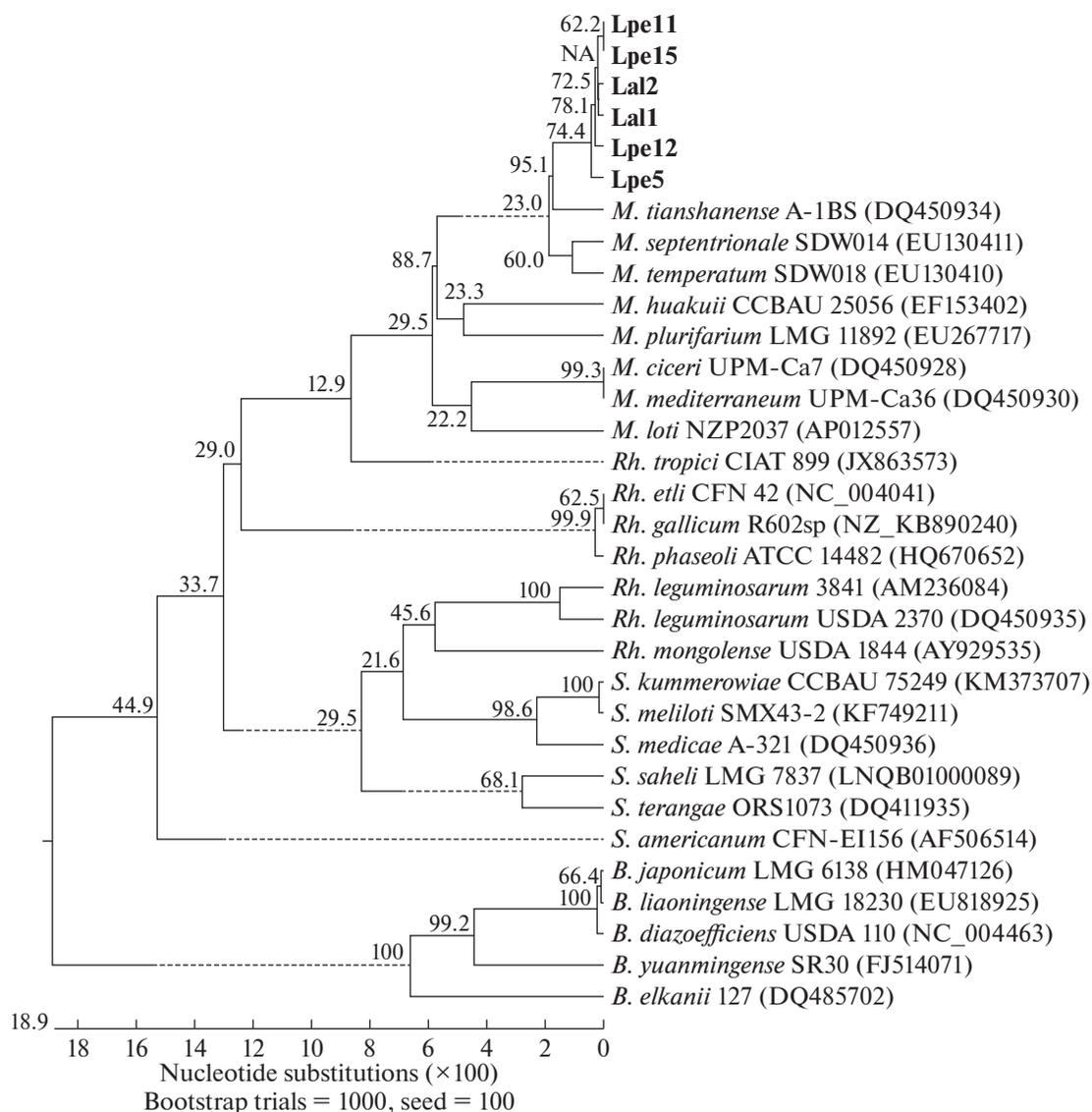


Рис. 3. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена *nifH*. Полу жирным шрифтом отмечены исследованные нами штаммы микроорганизмов.

ключение составил только один штамм, который имел большее родство с бактериями рода *Rhizobium*.

Анализ филогении симбиотических генов исследуемых штаммов бактерий был проведен на основании сравнительного анализа последовательностей генов *nodC* и *nifH* штаммов с аналогичными последовательностями других клубеньковых бактерий, взятых из базы данных GenBank (рис. 3, 4).

В ходе исследования было выявлено, что все взятые в анализ штаммы клубеньковых бактерий имеют в составе генома симбиотические гены, в основном характерные для бактерий рода *Mesorhizobium*, включая также штамм, который по последовательности генов домашнего хозяйства более близок к бактериям рода *Rhizobium*. Вероят-

но, образование подобного химерного штамма (*Rhizobium* sp. с симбиотическими генами бактерий рода *Mesorhizobium*) произошло вследствие горизонтального переноса симбиотических генов.

Одним из характерных признаков бобовых растений является их способность образовывать азотфиксирующий симбиоз с клубеньковыми бактериями. Для данного типа взаимодействия бактерий и растений характерна высокая специфичность, при которой каждый вид растений обладает определенным спектром микросимбионтов, а каждый штамм клубеньковых бактерий имеет фиксированный круг хозяев [19]. Согласно теории групп перекрестной инокуляции, предложенной Фредом и соавт. [20], бобовые растения состоят из видов, способных к свободному перезараже-

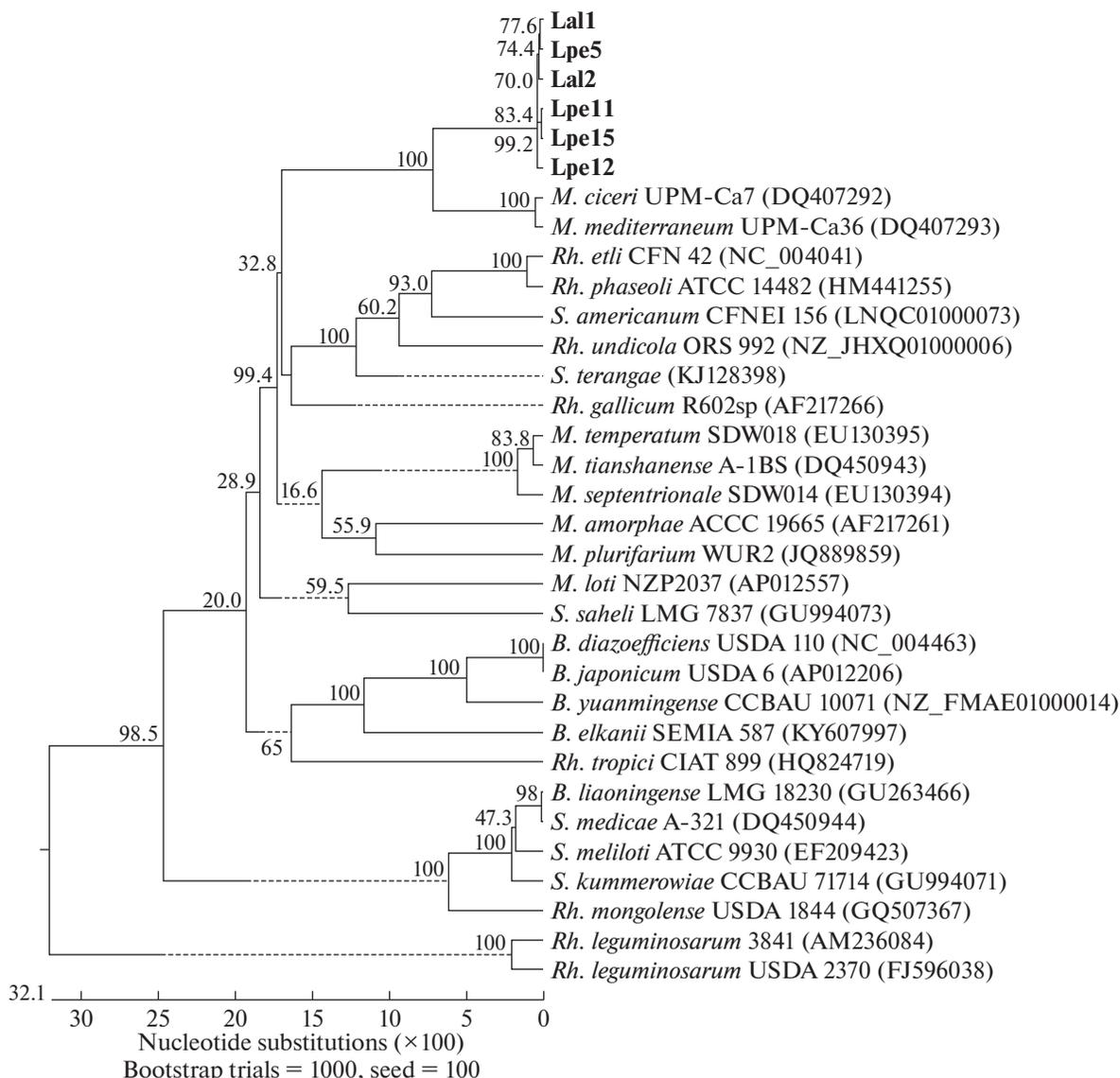


Рис. 4. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена *nodC*. Полу жирным шрифтом отмечены исследованные нами штаммы микроорганизмов.

нию ризобиями, т.е. имеющих единый пул микросимбионтов [21]. Хотя вначале было предложено 16 групп перекрестной инокуляции (ГПИ), в свете новых исследований в этой области на сегодняшний день можно выделить только четыре истинные ГПИ, одной из которых являются растения рода *Trifolium* и их микросимбионты *Rhizobium leguminosarum*, которые раньше выделяли в отдельный биовар *trifolii*. Подобное строгое специфичное взаимодействие растений данного рода с определенной группой бактерий является эволюционно сложившимся феноменом и должно приниматься во внимание при интерпретации филогении и систематики тех или иных групп бобовых. Полученные нами данные показывают, что изученные виды рода *Lupinaster* не образуют симбиотические

связи с классическими для рода *Trifolium* бактериями рода *Rhizobium*, а образуют его с бактериями, относящимися к роду *Mesorhizobium*. В умеренной зоне последние больше характерны для других групп бобовых, например, принадлежащих к трибе *Galegeae* [22].

За выбор симбиотического партнера со стороны ризобий отвечают симбиотические гены, а именно гены вирулентности (*nod/nol/noe*). В геноме данные гены совместно с другими представителями группы симбиотических генов (*nif/fix*) локализованы компактно либо в специфических геномных компартаментах в составе крупных плазмид, либо в пределах хромосомных островков, ограниченных IS-подобными элементами, благодаря чему часто бывают вовлечены в про-

цессы горизонтального переноса генов [23]. Вследствие этого нередко образуются штаммы ризобий с измененной специфичностью, содержащие в своем составе “чужие” симбиотические гены. Для исключения влияния данного обстоятельства на состав симбиотических бактерий исследуемых растений был проведен филогенетический анализ некоторых симбиотических генов. В ходе данного исследования было показано, что полученные штаммы бактерий содержат *sym*-гены, характерные для бактерий рода *Mesorhizobium*. Вероятно, бактерии данного рода являются обычными микросимбионтами растений *Lupinaster*, и в данном случае мы не имеем дело с измененной специфичностью бактерий в ходе горизонтального переноса генов, например, из-за переноса симбиотических генов от бактерий *R. leguminosarum* bv. *trifolii* – специфичных симбиотических партнеров растений *Trifolium*. О том, что данное взаимодействие является довольно специфичным, говорит и тот факт, что обнаруженный нами единственный штамм, филогенетически идентифицированный как *R. leguminosarum*, в составе своего генома также содержал симбиотические гены, обнаруживаемые у бактерий рода *Mesorhizobium*, которые скорее всего как раз и были получены путем горизонтального переноса генов и это дало им возможность вступать в симбиоз с растениями *Lupinaster*.

Хотя образующиеся химерные штаммы клубеньковых бактерий, т.е. бактерий, имеющих в составе своего генома “чужие” симбиотические гены, не являются стабильными и в основном не приводят к образованию эффективных штаммов, но тем не менее обнаружение их в клубеньках дикорастущих бобовых растений не является исключительным событием.

Обнаруженный нами генетический состав клубеньковых бактерий у изученных видов рода *Lupinaster* является дополнительным косвенным аргументом, подтверждающим гипотезу о том, что данные растения не относятся к роду *Trifolium*.

Интересным оказывается также то, что филогении симбиотических генов и генов домашнего хозяйства имеют определенные различия. Если на дендрограмме, построенной на основании сравнительного анализа последовательностей *rrs* и *recA*, исследованные бактерии относятся к разным кладам внутри бактерий рода *Mesorhizobium* и даже относятся к бактериям рода *Rhizobium*, то на дендрограмме, построенной на основе сравнительного анализа симбиотических генов, все образцы составляют одну компактную кладу. Значит, хотя микросимбионты растений люпинастер филогенетически различаются, тем не менее они содержат в составе своего генома гомологичные симбиотические гены. Это говорит о том, что при выборе растениями своих симбионтов более важ-

ным для них является фенотип микроорганизмов, детерминированный определенными генетическими вариантами симбиотических генов, а не видовая принадлежность самих бактерий.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ р_а № 17-44-020201.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бобров Е.Г. Клевер – *Trifolium* L. // Флора СССР. Т. XI. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1945. С. 189–261.
2. Бобров Е.Г. Люпинник – *Lupinaster* Adans // Флора европейской части СССР. Т. VI. Л.: Наука, 1987. С. 208–209.
3. Росков Ю.Р. О направлениях эволюции и основных таксономических подразделениях в группе *Trifolium* s. l. (Fabaceae) // Ботан. журн. 1989. Т. 74. С. 36–43.
4. Яковлев Г.П. Бобовые земного шара. Л.: Наука, 1991. 144 с.
5. Положий А.В., Выдрин С.Н., Курбатский В.И. Флора Сибири. Fabaceae (Leguminosae). Т. 9. Новосибирск: Сибирск. издат. фирма ВО “Наука”, 1994. 280 с.
6. Бобров Е.Г. Об объеме рода *Trifolium* s. l. // Ботан. журн. 1967. Т. 52. № 11. С. 1593–1599.
7. Mutch L.A., Young J.P. Diversity and specificity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* on wild and cultivated legumes // Mol. Ecol. 2004. V. 13. P. 2435–2444. doi 10.1111/j.1365-294X.2004.02259.x
8. Roumiantseva M.L., Andronov E.E., Sharypova L.A. et al. Diversity of *Sinorhizobium meliloti* from the Central Asian Alfalfa gene center // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. P. 4694–4697. doi 10.1128/AEM.68.9.4694-4697.2002
9. Eardly B., Elia P., Brockwell J. et al. Biogeography of a novel *Ensifer meliloti* clade associated with the Australian Legume *Trigonella suavissima* // Appl. Environ. Microbiol. 2017. V. 83. e03446-16. doi 10.1128/AEM.03446-16
10. Andrews M., Andrews M.E. Specificity in Legume-Rhizobia symbioses // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. P. 705. doi 10.3390/ijms18040705
11. Bailly X., Olivieri I., Brunel B. et al. Horizontal gene transfer and homologous recombination drive the evolution of the nitrogen-fixing symbionts of *Medicago species* // J. Bacteriol. 2007. V. 189. P. 5223–5236. doi 10.1128/JB.00105-07
12. Sprent J. Nodulation in legumes // Ann. Bot. 2002. V. 89. № 6. P. 797–798. doi 10.1093/aob/mcf128
13. Wdowiak-Wrobel S., Marek-Kozaczuk M., Kalita M. et al. Diversity and plant growth promoting properties of rhizobia isolated from root nodules of *Ononis arvensis* // Antonie van Leeuwenhoek. 2017. V. 110. P. 1087–1103. doi 10.1007/s10482-017-0883-x
14. Баймиев А.Х., Птицын К.Г., Баймиев А.Х. Влияние интродукции Караганы древовидной на состав ее клубеньковых бактерий // Микробиология. 2010. Т. 79. № 1. С. 123–128. doi 10.1134/S0026261710010157

15. Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 22. P. 6531–6535.
16. Laguerre G.P., Mavingui M.R., Allard M.P. et al. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 2029–2036.
17. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 697–703.
18. Баймиев Ан.Х., Иванова Е.С., Гуменко Р.С. и др. Анализ симбиотических генов клубеньковых бактерий бобовых растений Южного Урала // Генетика. 2015. Т. 51. № 12. С. 1359–1367.
19. Проворов Н.А., Воробьев Н.И., Тихонович И.А. Генетические основы эволюции растительно-микробного симбиоза. СПб.: Информ-Навигатор, 2012. 400 с.
20. Fred E.B., Baldwin I.L., McCoy E. Root nodule bacteria and leguminous plants. Madison: Univ. Wisconsin Stud. Sci., 1932. 343 p.
21. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агро-систем будущего. Изд-во СПб. ун-та, 2009. 210 с.
22. Баймиев Ан.Х., Иванова Е.С., Птицын К.Г. и др. Генетическая характеристика клубеньковых бактерий Южного Урала // Мол. генет. микробиол. и вирусол. 2012. № 1. С. 29–34. doi 10.3103/S0891416812010028
23. Provorov N.A., Vorobyov N.I. Evolution of symbiotic bacteria in “plant-soil” systems: interplay of molecular and population mechanisms // Progress in Environmental Microbiology / Ed. Kim M.-B. N.Y.: Nova Sci. Publ., Inc., 2008. P. 11–67.

Genetic Diversity and Phylogeny of Root Nodule Bacteria Isolated from Nodules of Plants of the Genus *Lupinaster* Grown in the Southern Urals

An. Kh. Baymiev^{a,*}, E. S. Akimova^a, R. S. Gumenko^a, A. A. Vladimirova^a,
A. A. Muldashev^b, A. V. Chemeris^a, and Al. Kh. Baymiev^a

^aInstitute of Biochemistry and Genetics Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

^bUfa Institute of Biology Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

*e-mail: baymiev@anrb.ru

The genetic diversity and phylogeny of *Lupinaster* Adans genus plants (*L. albus* Link and *L. pentaphyllus* Moench) nodule bacteria were investigated, also their symbiotic genes were analyzed. According to the results of our research, it was shown that the nodule bacteria of these plants have certain phylogenetic differences, but nevertheless all of them are close to *Mesorhizobium* genus, except of single strain that is phylogenetically close to *Rhizobium* genus. Analysis of symbiotic genes (*nifH* and *nodC*) revealed high homology of these genes sequences in all analyzed bacteria and their phylogenetic proximity to similar genes, typical for *Mesorhizobium* genus bacteria. Probably, *Mesorhizobium* bacteria are typical microsymbionts of these plants, and detected *Rhizobium* genus bacteria strain has acquired an ability to form nodule on the root of *Lupinaster* plant by acquisition of symbiotic genes in the process of horizontal gene transfer. The revealed genetic composition of nodule bacteria in the studied species of *Lupinaster* genus plants provides one more argument for confirming the opinion that they are not representatives of *Trifolium* genus.

Keywords: nodule bacteria, symbiotic genes, phylogeny, symbiosis, legumes.