

**SA AFLP АНАЛИЗ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ  
ДНК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ *HIN*-РЕГИОНА  
*RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM*, СПОСОБНЫХ  
К ЭФФЕКТИВНОЙ НОДУЛЯЦИИ *PISUM SATIVUM* И *VICIA FABA***

**Н. В. Пунина<sup>1</sup>, С. А. Хапчаева<sup>1</sup>, В. С. Зотов<sup>1</sup>, С. В. Дидович<sup>2</sup>, А. Ф. Топунов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва, Россия;

<sup>2</sup> Институт сельского хозяйства Крыма НААНУ, Симферополь, АР Крым, Украина.

E-mail: [hin-enkelte@yandex.ru](mailto:hin-enkelte@yandex.ru)

Нами было проанализировано 29 штаммов, принадлежащих к роду *Rhizobium* и способных к эффективной нодуляции *Pisum sativum* и *Vicia faba*. С помощью генетических методов (сравнительный анализ генов 16S рРНК и *gyrB*) штаммы были достоверно идентифицированы как *R. leguminosarum*. Сравнительный анализ генов *rpoB*, *nodD/nifD-K* позволил установить принадлежность данных изолятов к *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Оценка симбиотического потенциала посредством анализа *sym*-генов показала высокий уровень полиморфизма у штаммов, выделенных из клубеньков *P. sativum*, в то время как у клубеньковых изолятов *V. faba* наблюдался высоко консервативный пул *sym*-генов.

Ранее нами был предложен модифицированный специально для симбиотических бактерий метод saAFLP, а также найден специфический для рода маркер *hin*-регион, которые прошли успешную апробацию на других штаммах *Rhizobium* spp. Нами были исследованы все штаммы с помощью данных методов.

Штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae* были разделены на IA- и IB-генотипы по *hin*-региону, что, как было предположено, могло быть связано со специфичностью и эффективностью симбиоза с растениями *P. sativum* и *V. faba* (рисунок).

Так, на *P. sativum* был показан различный морфогенез клубеньков, при котором инокуляция растения штаммами IA-генотипа способствует образованию нормальных палочковидных клубеньков, а в случае обработки ризобиями IB-генотипа – приводит к появлению “химерных” клубеньков (бобового-горохового типа). Аналогичная картина, только для IB-генотипа наблюдалась и для *V. faba*.

Была также показана достоверная зависимость количества образуемых клубеньков от типа инокуляции: в случае инокуляции растений несколькими генотипами ризобий (IA- и IB-) наблюдалось значительное снижение количества клубеньков, а в случае инокуляции одним из генотипов число клубеньков было в разы больше.

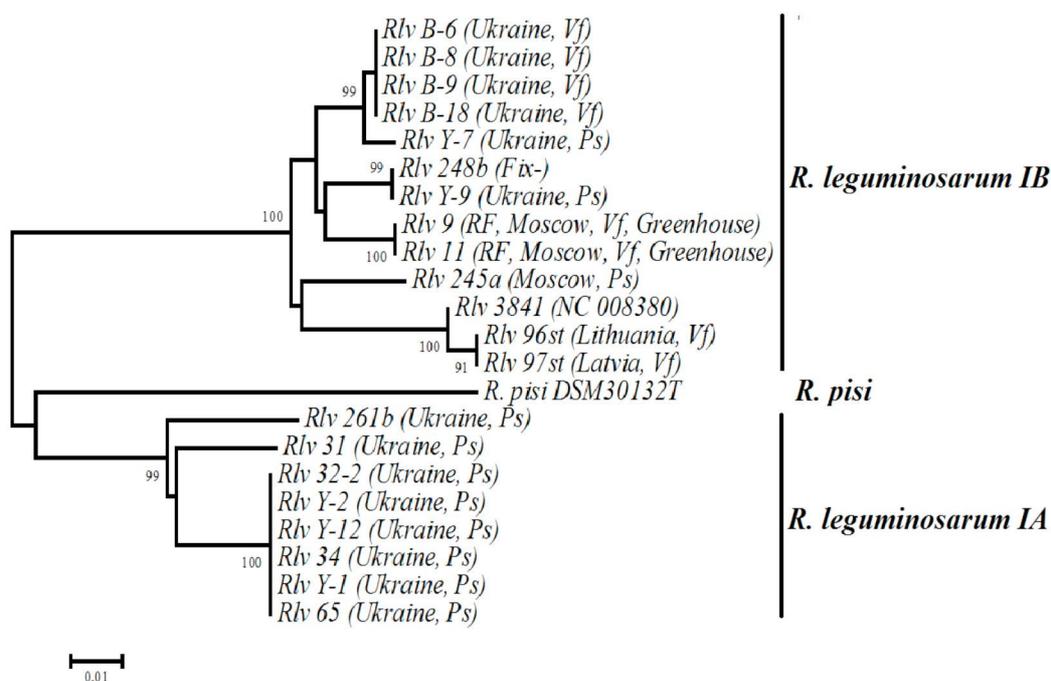
При этом была выявлена положительная корреляция между кластеризацией штаммов ризобий по *nodD/nifD-K*-генам и по *hin*-региону на IA- и IB-генотипы.

Следует отметить, что данные о таксономической структуре, полученные с помощью saAFLP анализа и анализа ДНК последовательности *hin*-региона, коррелировали

с литературными данными, полученными с помощью существующих в настоящий момент фенотипических и генетических методов. Однако нуклеотидная последовательность обладала большей разрешающей способностью (6 нуклеотидных замен на 100 п.о. для биовара), чем широко применяемая сейчас для идентификации последовательность *groB* гена.

Таким образом, saAFLP анализ и *hin*-регион могут быть применены в качестве дешевых, быстрых, воспроизводимых методов для определения принадлежности бактерии к роду- виду, а также для изучения внутривидового полиморфизма. *Hin*-регион, в частности, может быть применен для экспресс-поиска штаммов ризобий, способных образовывать наиболее эффективные пары с той или иной бобовой зерновой культурой.

Данная работа проводилась в рамках договора о научном сотрудничестве между Институтом биохимии им. А.Н. Баха и отделом микробиологии Института сельского хозяйства Крыма НААНУ, при финансовой поддержке ООО “Гринвайд” и целевой программы Президиума РАН «Поддержка молодых ученых».



Филогенетическое дерево, построенное для штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae* по результатам сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей *hin*-региона с помощью алгоритма NJ. Масштаб соответствует 1 заменам на 100 п.о. Цифрами указана статистическая значимость порядка ветвления (в %), определенная с помощью бутстреп-анализа 1000 альтернативных реплик.