

УДК 579.841.3

В.С. Зотов¹, Н.В. Пунина^{1,2}, С.А. Хапчаева¹, С.В. Дидович³, А.Ф. Топунов¹
**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ saAFLP И *hin*-РЕГИОН ПЦР
ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ
РИЗОБИЙ - СИМБИОНТОВ *PHASEOLUS VULGARIS*.**

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии им. А.Н.Баха Российской академии наук,

² Федеральное государственное бюджетное учреждение
Медико-генетический научный центр Российской академии медицинских наук,

³ Институт сельского хозяйства Крыма НААН Украины

Среди бобовых фасоль обыкновенная (*Phaseolus vulgaris* L.) является второй после сои (*Glycine max* L. Merr.) по значимости и главной сельскохозяйственной культурой данного рода (Cristou, 1997). Это один из наиболее распространенных во многих районах тропического, субтропического и умеренного климата видов пищевых бобовых (Singh, 1999).

Фасоль обыкновенная имеет два главных центра генетического разнообразия, из которых Мезоамериканский генцентр, включающий Мексику, Колумбию, Эквадор и северную часть Перу, вероятно, является первичным (Gepts and Debouck, 1991; Kaplan, 1965).

Андский центр, который включает регионы от южной части Перу до северной части Аргентины, является вторичным генцентром (Gepts and Debouck, 1991; Kaplan, 1965).

В настоящий момент известно о 9 генных пулах, составляющих генетическое разнообразие *Phaseolus vulgaris*, и трех отличных групп ризобий, способных образовывать клубеньки на них (Martinez-Romero et al, 1991; Singh et al, 1991).

Различные климатические и географические условия, в которых эти генные пулы найдены (Gepts and Debouck, 1991), позволяют предположить, что, возможно, существуют специфические взаимодействия между сортами фасоли и штаммами ризобий по отношению к различному климату, окружающей среде и конкретным местам обитания (Kellman, 2008).

Одной из главных причин слабого проявления ассоциации *Phaseolus-Rhizobium* является наличие большого количества местных штаммов *Rhizobium leguminosarum* *bv.* *phaseoli*, которые образуют клубеньки с фасолью, и характеризующиеся средней и низкой эффективностью или полным отсутствием фиксации азота (Moxley et al., 1986).

Исследования также выявили высокую степень фиксации азота у штаммов *Rhizobium etli* (Graham et al., 2003; Kellman, 2008).

Тем не менее, часто не обеспечиваются их агрономические преимущества в поле, так как в результате конкурентной борьбы с аборигенными почвенными ризобиями, они не способны образовать устойчивый симбиоз.

Аборигенные почвенные ризобии часто являются более конкурентоспособными и образуют клубеньки, чем штаммы, применяемые в качестве инокулянтов (Graham, 1981), однако они обладают меньшей симбиотической эффективностью (более низкой эффективностью

в отношении фиксации азота) и, соответственно, являются менее полезными для увеличения урожайности.

Поэтому актуальным в настоящее время является вопрос изучения генетического разнообразия штаммов-симбионтов фасоли и оценка их на перспективность использования в сельскохозяйственной практике.

Анализ последовательностей гена 16S рРНК и ДНК-ДНК гибридизация являются широко применяемыми и объективными протоколами в бактериальных таксономических исследованиях.

Однако использование только гена 16S рРНК как филогенетического маркера затруднено тем, что он может присутствовать в геноме одной бактерии в нескольких копиях (Haukka et al., 1996), подвержен генетическим рекомбинациям и горизонтальному генному переносу (van Berkum et al., 2003), а также его нуклеотидная последовательность является высоко консервативной среди близких видов (Vinuesa et al., 2005).

Техника ДНК-ДНК гибридизации имеет большую разрешающую силу и штаммы, показывающие 70% сходство или выше, классифицируются как один вид (Stackebrandt et al., 2002).

Однако эта техника является трудоёмкой, длительной и, порой, невоспроизводима (Rosselló-Mora, 2006), что приводит к противоречивым результатам по одним и тем же штаммам. Анализ межгенного региона, также широко применяющийся для изучения меж- и внутривидового разнообразия среди различных родов бактерий в данном случае неприменим, вследствие наличия 2 и более копий рибосомального оперона 16S-23S рРНК.

В настоящее время в качестве филогенетических маркеров для дифференциации близкородственных видов используются белок-кодирующие гены и межгенные регионы.

Данные гены быстрее эволюционируют, чем 16S рРНК ген, и являются достаточно консервативными для аккумуляции генетической информации.

При анализе мультилокусного секвенирования (MLSA) используются последовательности нескольких "housekeeping"-генов (генов «домашнего хозяйства»), обладающих большей разрешающей способностью, чем анализ последовательностей гена 16S рРНК и ДНК-ДНК гибридизации.

Помимо надёжности, MLSA также является быстрым и экономичным методом для видовой идентификации (Aserse et al., 2012).

Одним из генов, часто включаемых в MLSA исследования, является ген *guyB*. Ген, кодирующий субъединицу Б ДНК-гиразы, белок, выполняющий важную функцию в жизнеобеспечении организма (Wang, 1990), находится в единичной копии в геноме и не подвергается рекомбинационным событиям, в связи с чем данный ген был предложен в качестве филогенетического маркера при идентификации и классификации бактерий (Yamamoto and Narayana, 1996; Yamamoto et al., 1999). В наших исследованиях мы использовали данный ген в качестве наиболее перспективного диагностического маркера для определения родовой-видовой принадлежности бактерии (Пунина, 2009).

Другим маркером, расположенным на хромосоме и предложенным нами ранее является *hin*-регион (Зотов с соавт., 2011, 2012), позволяющим изучить внутри и межвидовое разнообразие бактерий.

Немаловажным подходом к изучению происхождения и разнообразия ризобий, а также к формированию высокоэффективных растительно-микробных систем, является анализ нуклеотидных последовательностей симбиотических генов (*nodC* и *nifH* (Laguerre et al., 2001; Silva et al., 2003), *nodD* (Zeze et al., 2001; Laguerre et al., 1996), *nifD-K* (Laguerre et al., 1996) и других). Так как такие гены часто сцеплены с одной и той же плазмидой, то они демонстрируют сходные эволюционные модели, что было подтверждено в работах разных исследователей (Laguerre et al., 2001; Dresler et al., 2007; Lei et al., 2008).

Также существует гипотеза межвидового переноса генов, которая подтверждается высоким уровнем сходства *sym*-генов внутри подгруппы *bv. phaseoli* и совместным присутствием штаммов *R. leguminosarum*, *R. gallicum* и *R. giardinii* в Европе (Geniaux et al., 1993; Sessitsch et al., 1997; Herrera-Cervera et al., 1999).

Таким образом, при описании генетического разнообразия клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* симбионтов фасоли и оценке их на перспективность использования в сельскохозяйственной практике нами был применен комплексный анализ как хромосомных, так и симбиотических, плазмидных, маркеров.

Также актуальным является поиск генетических маркеров, сцепленных с вышеописанными белок-кодирующими генами, и обеспечивающих максимально эффективный и экономичный анализ ризобий при больших выборках микросимбионтов.

Целью исследований являлась оценка разрешающей способности техник *saAFLP* и *hin*-регион ПЦР в сравнении с генетическими маркерами *16S* рРНК, *16S-23S* рРНК, *nodD*, *nifD-K* и *guyB* для изучения разнообразия и происхождения бактерий рода *Rhizobium* симбионтов фасоли на внутривидовом уровне.

Материалы и методы.

Бактериальные штаммы. В работе были использованы 13 изолятов и штаммов клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* из различных коллекций микроорганизмов Украины и России (табл. 1).

Таблица 1. Бактериальные штаммы

Штамм	Растение-хозяин	Географическое происхождение	Коллекция
<i>Rhizobium</i> sp. 682	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Украина	ВНИИСХМ
<i>Rhizobium</i> sp. ФА-4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Украина, Харьковская обл.	ИСХК
<i>Rhizobium</i> sp. ФА-34	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Украина, Харьковская обл.	ИСХК
<i>Rhizobium</i> sp. ФК-0	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Украина, Харьковская обл.	ИСХК
<i>Rhizobium</i> sp. ФК-4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Украина, Харьковская обл.	ИСХК
<i>Rhizobium</i> sp. ФК-6	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Украина, Харьковская обл.	ИСХК
<i>Rhizobium</i> sp. ФН	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Украина, Харьковская обл.	ИСХК
<i>Rhizobium</i> sp. ФН-6	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Украина, Харьковская обл.	ИСХК
<i>Rhizobium</i> sp. Ф-1g	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Украина, Харьковская обл.	ИСХК
<i>Rhizobium</i> sp. ФС	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Украина, Харьковская обл.	ИСХК
<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i> 105	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Армения	ВНИИСХМ
<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i> 700-st	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Мексика	ВНИИСХМ
<i>Rhizobium phaseoli</i> B-6923 T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	ВКПМ

ИСХК – коллекция отдела микробиологии Института сельского хозяйства Крыма НААН Украины;
ВНИИСХМ - Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии РАСХ;
ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (Москва).

Выделение ДНК. Для выделения препаратов суммарной клеточной ДНК штаммы культивировали на агаризованной среде ТУ: дрожжевой экстракт – 1 г/л; пептон – 10 г/л; CaCl₂ – 0,4 г/л; агар – 20 г/л (Beringer, 1974). Тотальная ДНК штаммов ризобий была выделена из свежих культур клеток на 1-2 сутки путем их лизиса (лизоцим-SDS) с последующей фенол-хлороформной экстракцией и осаждением изопропанолом (Laguerre et al., 1992).

Single adapter AFLP анализ. Процедура AFLP была исполнена, как описано ранее Valsangiasomo (1995), с некоторыми модификациями. 80 нг ДНК были смешаны с рестриктазой *Xma*I и легированы с одноцепочечным адаптером, специфичным к сайту рестрикции. Реакция рестрикции и легирования проходила одновременно при 37°C в течение 2 часов. Условия ПЦР с использованием праймера Pr.CTAG1 (5'-CTGGAATCGATTCCAGctag-3') были такими же, как описано нами ранее (Зотов с соавт., 2012).

ПЦР амплификация. ПЦР амплификацию нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК проводили с использованием праймеров FD1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' и RD1: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3' (Weisburg et al., 1991), а для последующего секвенирования – BD_F и BD_R (Коростик с соавт., 2006), межгенного региона рибосомального кластера (ITS) с праймерами FGPS1490-72: 5'-TGCGGCTGGATCCCCTCCTT-3' (Normand et al., 1992) и ITS_R: 5'-CGCAGCGTATCACGTCC TTC-3' (Зотов с соавт., 2012), *hin*-региона с использованием разработанных нами специфических для рода *Rhizobium* праймеров Pr.rhizF и Pr.rhizR (Зотов с соавт., 2011), рецепторного гена *nodD2* с праймерами NODD2PH678: 5'-TGAGTTGCAAGGGCCTTGATC-3' и NODD3 PH2152: 5'-AGATGACTGCGCCCCCGATAG-3' (Laguerre et al., 1996), генов субъединиц нитрогеназы *nifD*-K с праймерами FGPD807: 5'-CACTGCTACCGGTTCGATGAA-3' и FGPK492: 5'-GATGACCTCGGCCAT-3' (Laguerre et al., 1996), гена гиразы субъединицы B *gyr B* с праймерами UP1: 5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA Y GCNGGNGGNAARTTYGA-3' и UP2r: 5'-AGCA GGGTACGATGTGCGAGCCRTCNACRTCN G CRTCNGTCAAT-3' (Yamamoto et al., 1995).

Анализ нуклеотидных последовательностей. Первичный сравнительный анализ полученных последовательностей с последовательностями базы данных ГенБанка был проведен с помощью программы NCBI Blast (Altschul et al., 1990).

Выравнивание последовательностей и построение матриц нуклеотидного сходства проводили с помощью программы BioEdit 7.0.5.2 (Hall, 1999).

Филогенетические деревья были построены в программе Mega 3.1 (Kumar et al., 2004) с помощью алгоритма Neighbor-Joining NJ (Nei and Kumar, 2000). По парные генетические расстояния между последовательностями были определены по двухпараметрической модели Кимуры (Kimura, 1980).

Результаты и обсуждение. Анализ гена 16S рибосомальной РНК. Полные ДНК последовательности гена 16S рРНК были получены для всех исследуемых изолятов и штаммов *Rhizobium sp.* Для каждого вида клубеньковых бактерий-симбионтов фасоли в базе данных NCBI были найдены последовательности гена 16S рРНК типовых штаммов, которые также были взяты для анализа. В качестве удаленного контроля была использована ДНК последовательность 16S рРНК типового штамма *Bradyrhizobium japonicum DSM30131^T* и построено филогенетическое дерево (рис.1). По результатам анализа полных нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК исследуемые изоляты, выделенные в Харьковской области, были достоверно отнесены к 2 видам рода *Rhizobium*: изоляты 682, ФА-4, ФА-34, ФК-0, ФК-4, ФК-6, ФН, ФН-6, также как и штамм 105, выделенный в Армении, к виду *R. leguminosarum* (Frank, 1889), а изоляты ФС и Ф-1g к виду *R. giardinii* (Amarger et al., 1997). Стоит отметить, что коллекционный штамм *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* 700-st, по последовательности 16S рРНК был отнесен к виду *R. etli* (Segovia et al., 1993). Однако, вследствие частых межвидовых рекомбинаций между различными аллелями гена 16S рРНК внутри рода *Rhizobium*, для точного определения видовой принадлежности штамма 700-st необходимо провести анализ дополнительных хромосомных маркеров.

По результатам тестов на инокуляцию растений-хозяев, все исследуемые изоляты образывали клубеньки на фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris* L.) и принадлежали биовару (bv.) *phaseoli* (Зотов с соавт., 2012).

Анализ межгенного региона 16S-23S рРНК (ITS). Нами был проведен ПЦР анализ ITS бактерий рода *Rhizobium*, который показал, что 4 из 13 штаммов имеют 2 ПЦР-продукта, отличных не только по длине, но и по нуклеотидному составу (Laguerre et al., 1996; Palmer, Young, 2000; Зотов с соавт., 2012). Известно, что высокий уровень нуклеотидной изменчивости ДНК последовательности ITS региона позволяет различать близкородственные штаммы, однако многокопийность ITS регионов затрудняет интерпретацию филогенетических связей (Gürtler and Stanisich, 1996).

По результатам секвенирования и сравнительного анализа полных нуклеотидных последовательностей ITS региона (Зотов с соавт., 2012) “двойные” продукты ITS-ПЦР имеют разное происхождение: одна из копий принадлежит к виду *R. leguminosarum* (its-L – продукт ITS-ПЦР высокой молекулярной массы), другая – к *R. etli* (its-S – ITS-ПЦР продукт более низкой молекулярной массы). Вероятно, это указывает на горизонтальный перенос или частые рекомбинационные события, происходящие между ДНК последовательностями различных видов бактерий данного рода (Terefework et al., 1998).

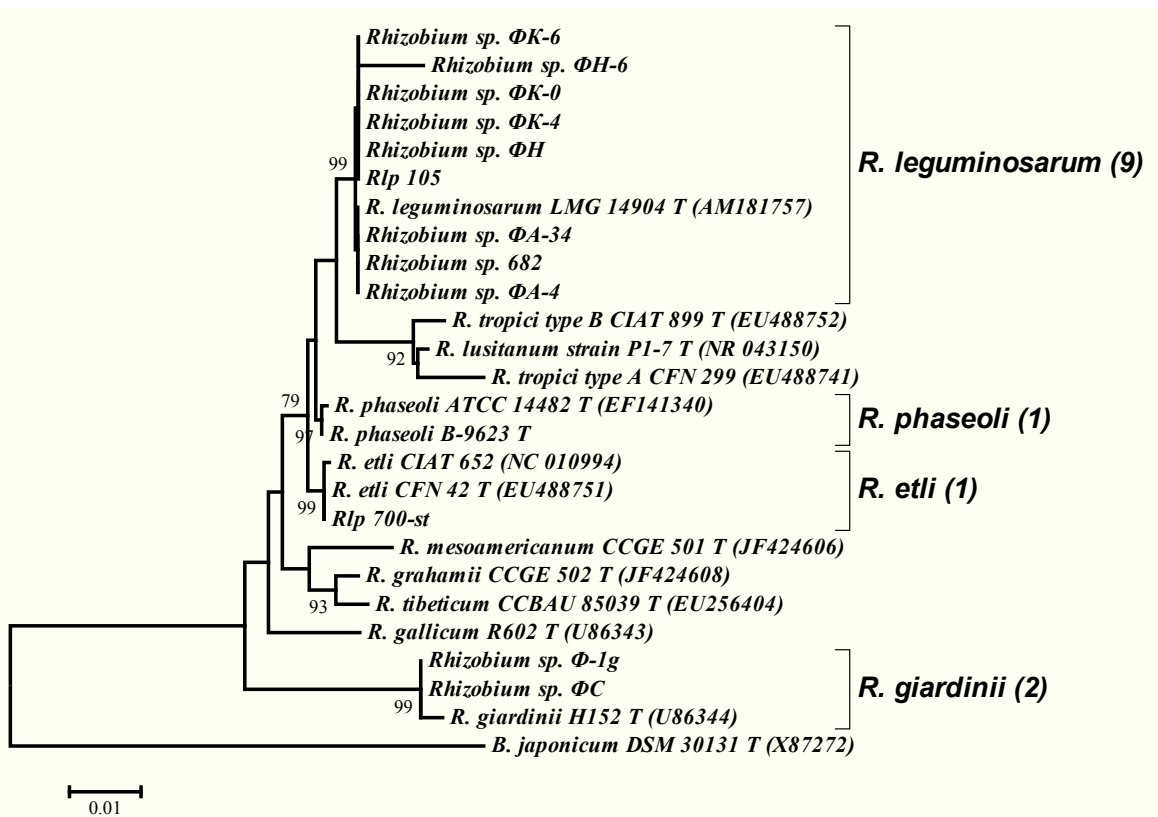


Рис.1. Филогенетическое дерево, построенное на основе данных сравнительного анализа полных нуклеотидных последовательностей гена 16S рПНК бактерий рода *Rhizobium* с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 1 замене на 100 пар оснований. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap»-анализа 1000 реплик. Значения «bootstrap» ниже 70% не показаны. *Rlp* – *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. В скобках указано количество исследованных штаммов в группе.

Анализ нуклеотидных последовательностей *hin*-региона (Зотов с соавт., 2012). Секвенирование и дальнейшее сравнение нуклеотидных последовательностей *hin*-региона показало, что изоляты ризобий из клубеньков фасоли принадлежали к 6 генетически удалённым группам (рис. 2): *R. leguminosarum* (генотипы I/A, I/B, II, III), *R. phaseoli* (генотип V) и *R. giardinii* (генотип IV). Интересно, что по данному маркеру штаммы *Rlp* 700-st и *R. etli* CIAT652 оказались ближе к типовому штамму *R. phaseoli* B-6923 T, нежели к типовому *R. etli* CFN42 T, что, вероятно, ставит под сомнение первоначальное отнесение их к видам *R. leguminosarum* и *R. etli*, соответственно. Полученные нами результаты согласуются с последними данными López-Guerrero с соавторами (López-Guerrero et al., 2012).

saAFLP. Для достоверного анализа внутривидового полиморфизма штаммов рода *Rhizobium* был использован saAFLP с применением эндонуклеазы рестрикции - *Xma*JI (Зотов с соавт., 2012).

По данным saAFLP 13 штаммов, инокулирующие фасоль, были достоверно разделены на 6 генотипов, относящихся к генетически разнородным группам «IA», «IB», «II», «III», «IV» и «V», что коррелировало с данными по сравнительному анализу ПЦР-продуктов и нуклеотидных последовательностей *hin*-региона. (рис.2 и 3). С помощью данного анализа удалось установить генетическую неоднородность штаммов *Rhizobium* - симбионтов фасоли из Харьковской области Украины. Таким образом, внутри однородной по последовательности гена 16S рПНК группы штаммов был показан значительный внутривидовой полиморфизм продуктов saAFLP клубеньковых бактерий симбионтов фасоли.

Анализ рецепторного гена – *nodD2*. По данным секвенирования нуклеотидных последовательностей продуктов амплификации *Rhizobium* sp. с праймерами NODD2PH678 и NODD3PH2152' штаммы ФН-6, ФА-4 и 700-st обладали практически идентичными последовательностями с рецепторным *nodD2* геном штамма *R. etli* CFN42 T (рис.4), что согласуется с ранее полученными данными для биовара *phaseoli* (Laguerre et al., 1996).

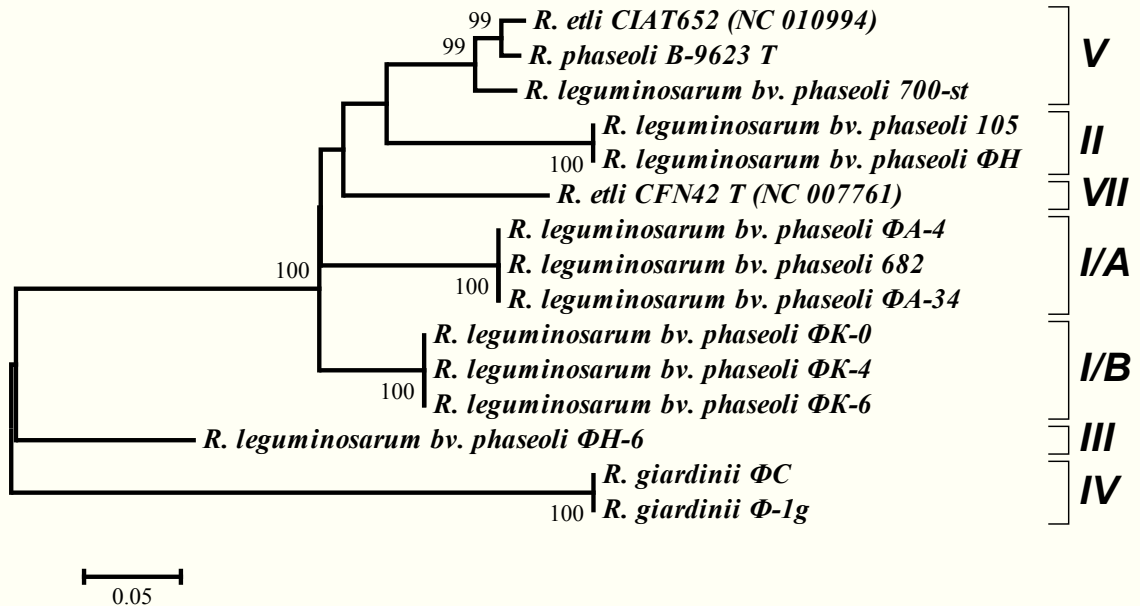


Рис.2. Филогенетическое дерево, построенное на основе данных сравнительного анализа последовательностей *hip*-региона *Rhizobium* sp. с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 5 заменам на 100 пар оснований. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap»-анализа (1000 реплик). Значения «bootstrap» ниже 70% не показаны. Римскими цифрами указаны генотипы ризобий (Зотов с соавт., 2012).

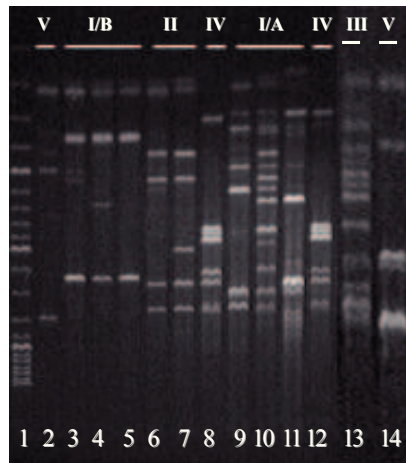


Рис.3. saAFLP анализ с использованием эндонуклеазы рестрикции *Xma*I для бактерий рода *Rhizobium* sp. 1- GeneRuler DNA Ladder Mix 1kb; 2- *Rlp* 700-st; 3- *R. leguminosarum* ФК-0; 4-ФК-6; 5-ФК-4; 6-ФН; 7-105; 9-682; 10-ФА-4; 11-ФА-34; 8- *R. giardinii* ФС; 12-Ф-1g; 13 – *Rlp* ФН-6; 14 – *R. phaseoli* B-6923 T.

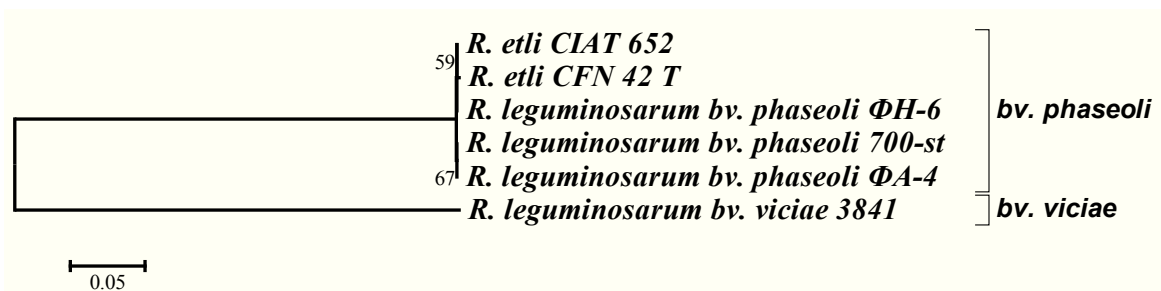


Рис.4. Филогенетическое дерево, построенное на основе данных сравнительного анализа последовательностей рецепторного *nodD* гена *Rhizobium* sp. с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 5 заменам на 100 пар оснований. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap»-анализа (1000 реплик).

Штаммы *R. giardinii* ФН-1g и ФС дали идентичный ПЦР-продукт с данными праймерами, однако, ввиду отсутствия достоверного сходства с гомологами данного гена в базе NCBI, утверждать, что это последовательность рецепторного *nodD* гена, нельзя.

Анализ генов субъединиц нитрогеназы - *nifD*-К. По данным секвенирования и сравнения нуклеотидных последовательностей продуктов амплификации *Rhizobium* sp. с праймерами FGPД807 и FGPK492 их полиморфизм для штаммов ФА-4, ФН, 105, 700-st, В-9623Т и ФН-6 составил от 0 до 1.7% (табл.2).

Для продукта амплификации штамма *R. giardinii* ФС наибольший процент сходства (77% при длине сравнения в 500 п.о.) был с нуклеотидной последовательностью гена *NGR_c12360* (*Sinorhizobium fredii* NGR234), продуктом которого является "putative SpoVR like protein" (вероятный SpoVR-подобный белок).

Анализ гена гиразы субъединицы Б - *gyrB*. По данным секвенирования и сравнения нуклеотидных последовательностей продуктов амплификации *Rhizobium* sp. с праймерами UP1 и UP2г выяснилось, что данные последовательности кодировали два гомологичных ризобиальных гена: ген субъединицы Б гиразы (*gyrB*) и ген субъединицы Б ДНК топоизомеразы IV (*parE*) с низким уровнем сходства между ними. Для всех штаммов симбионтов фасоли, в том числе типовых, были построены филогенетические деревья отдельно по каждому гену.

По результатам сравнения топологий деревьев кластеризация ризобий была статистически значимой с высоким уровнем достоверности ветвления и соответствовала разделению данных штаммов на генотипы по *hin*-региону (рис.5 и 6). Также была подтверждена принадлежность штамма CIAT652 к виду *R. phaseoli* (рис. 5).

Таблица 2. Матрица сходства нуклеотидных последовательностей генов субъединиц нитрогеназы *nifD*-К для штаммов *Rhizobium* sp.

	ФН	105	700-st	ФА-4	ФН-6	CFN 42 Т	CIAT 652	В-9623 Т	3841
<i>Rlp</i> * ФН	1.000								
<i>Rlp</i> 105	0.998	1.000							
<i>Rlp</i> 700-st	0.990	0.989	1.000						
<i>Rlp</i> ФА-4	0.986	0.985	0.993	1.000					
<i>Rlp</i> ФН-6	0.986	0.985	0.994	0.999	1.000				
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42 Т	0.986	0.985	0.994	0.999	1.000	1.000			
<i>Rhizobium etli</i> CIAT 652	0.989	0.989	0.991	0.992	0.993	0.993	1.000		
<i>Rhizobium phaseoli</i> В-9623 Т	0.984	0.983	0.988	0.993	0.992	0.992	0.994	1.000	
<i>Rlv</i> ** 3841	0.744	0.744	0.745	0.746	0.746	0.746	0.745	0.745	1.000

*Rlp** – *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*; *Rlv*** – *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

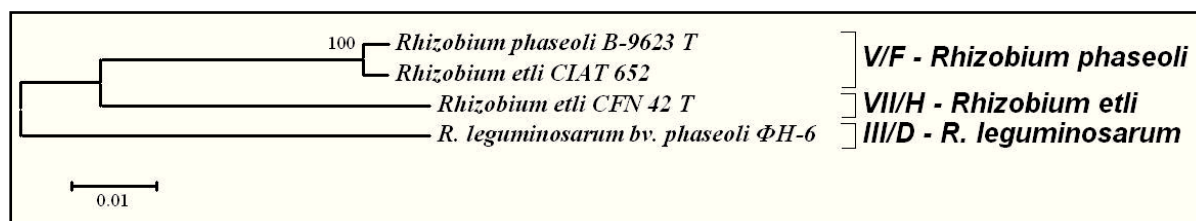


Рис.5. Филогенетическое дерево, построенное на основе данных сравнительного анализа последовательностей гена ДНК топоизомеразы IV субъединицы Б *Rhizobium* sp. с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 1 заменам на 100 пар оснований. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap»-анализа (1000 реплик). Значения «bootstrap» ниже 70% не показаны.

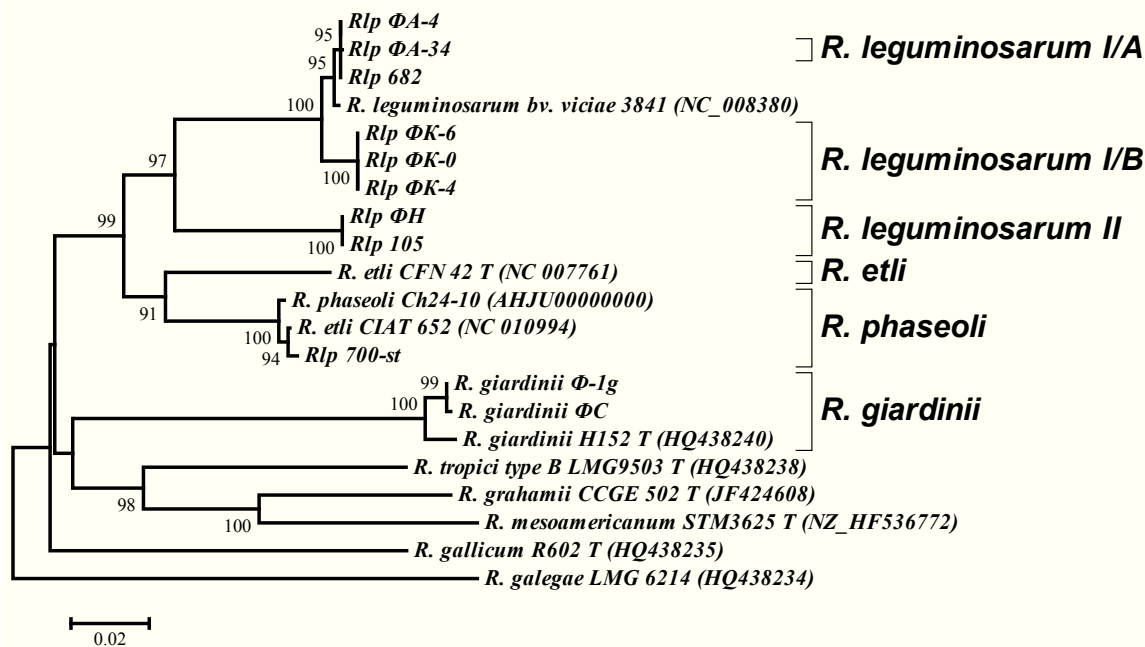


Рис.6. Филогенетическое дерево, построенное на основе данных сравнительного анализа последовательностей гена *gyrB* *Rhizobium* sp. с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 2 заменам на 100 пар оснований. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap»-анализа (1000 реплик). Значения «bootstrap» ниже 70% не показаны.

Выводы. Нами была показана видовая принадлежность штаммов-симбионтов фасоли, культивируемой в Харьковской области Украины к видам *R. leguminosarum* и *R. giardinii*, а также высокий уровень их генетического разнообразия: выявлено 5 генотипов (по данным сравнения последовательностей *hin*-региона и фингерпринтов saAFLP) из 7 описанных ранее (Зотов с соавт., 2012). По совокупности полученных нами генетических данных штамм *Rlp* 700-st следует переименовать в *R. phaseoli* 700-st, а обособленная группа штаммов генотипа II (по *hin*-региону и гену *gyrB*) и удаленный штамм *Rlp* ФН-6 могут претендовать на выделение в отдельные виды, что требует дальнейшего более подробного изучения.

У исследованных штаммов симбионтов фасоли отсутствовала корреляция между группированием штаммов по хромосомным (*hin*-регион и *gyrB*) и симбиотическим маркерам (*nodD2* и *nifD-K*), что соответствует существующему представлению о том, что филогения *nod*-генов хорошо коррелирует с систематикой бобовых растений-хозяев, но не с таксономией самих бактерий (Young, Johnston, 1989; Ueda et al., 1995; Suominen et al., 2001).

Также отмечена большая информативность предложенного нами маркера, в том числе на стадии визуализации количества и длин продуктов амплификации *hin*-региона, по сравнению с аналогами (16S рПНК, 16S-23S рПНК и *gyrB*), а в совокупности с техникой saAFLP становится возможным более эффективно описывать внутри- и межвидовое генетическое разнообразие клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* симбионтов фасоли.

Благодарность.

Данная работа проводилась в рамках договора о научном сотрудничестве между Институтом биохимии им. А.Н. Баха и отделом микробиологии Института сельского хозяйства Крыма при финансовой поддержке ООО «Гринвайд».

Литература

1. Заявка на патент. Российская Федерация. Способ идентификации и дифференциации прокариотических организмов / В. С. Зотов, Н. В. Пунина, А. Ф. Топунов; заявитель Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН. - № 20111135461 от 25.08.2011.
2. Зотов В. С. Новый таксономический маркер клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* и его эволюция / В. С. Зотов, Н. В. Пунина, С. А. Халчаева, С. В. Дидович [с соавт.] // Экологическая генетика. - 2012. - Т. 10. - С. 49-62.
3. Коростик Е. В. Универсальные 16S рПНК праймеры BD1 для описания генетического разнообразия сообщества почвенных прокариот / Е. В. Коростик, А. Г. Пинаев, Г. А. Ахтемова, Е. Е. Андронов // Экологическая генетика. - 2006. - Т. 4. - С. 32-37.
4. Пунина Н. В. Оценка генетического разнообразия фитопатогенных бактерий рода *Xanthomonas* sp. и разработка молекулярных маркеров для их диагностики : автореф. дис. на получение степени канд. биол. наук : спец. 03.00.07 «микробиология» / Н. В. Пунина. - Москва, - 2009. - 27 с.
5. Amarger N. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from Phaseolus vulgaris Nodules / N. Amarger, V. Macheret, G. Laguerre // Int. J. Syst. Bacteriol. - 1997. - V. 47. - P. 996-1006.
6. Aserse A. A. Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia / A. A. Aserse, L. A. Räsänen, F. Assefa [et al.] // Syst. Appl. Microbiol. - 2012. - V. 35. - P. 120-131.

7. Cristou P. Biotechnology applied to grain legumes / P. Cristou // Field Crops Research. - 1997. - V. 53. - P. 83-97.
8. Frank B. Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen / B. Frank // Ber Deut. Bot. Ges. - 1889. - V. 7. - P. 332-346.
9. Geniaux E. Comparison of geographically distant populations of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* / E. Geniaux, G. Laguerre, N. Amarger // Mol. Ecol. - 1993. - V. 2. - P. 295-302.
10. Gepts P. Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) / P. Gepts, D. Debouck // In: van Schoonhoven A., Voysest O. (Eds.), Common beans, research for crop improvement., CAB, Wallingford, UK, Cali-Colombia, - 1991. - P. 7-53.
11. Graham P. H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*: A review / P. H. Graham // Field Crops Research. - 1981. - V. 4. - P. 93-112.
12. Graham P. H. Addressing edaphic constraints to bean production: the Bean/Cowpea CRSP project in perspective / P. H. Graham, J. C. Rosas, C. Estevez de Jensen [et al.] // Field Crops Research. - 2003. - V. 82. - P. 179-192.
13. Gürtler V. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region / V. Gürtler, V. A. Stanisich // Microbiology. - 1996. - V. 142. - P. 3-16.
14. Haukka K. Diversity of partial 16S rRNA sequences among and within strains of African rhizobia isolated from *Acacia* and *Prosopis* / K. Haukka, K. Lindstrom, J. P. W. Young // Syst. Appl. Microbiol. - 1996. - V. 19. - P. 352-359.
15. Herrera-Cervera J. A. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil / J. A. Herrera-Cervera, J. Caballero-Medallo, G. Laguerre [et al.] // FEMS Microbiol. Ecol. - 1999. - V. 30. - P. 87-97.
16. Kaplan L. Archeology and domestication in American *Phaseolus* (beans) / L. Kaplan // Econ. Bot. - 1965. - V. 19. - P. 358-368.
17. Kellman A. W. *Rhizobium* inoculation, cultivar and management effects on the growth, development and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): a thesis Submitted in Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy / A. W. Kellman. - New Zealand. - 2008. - 257 P.
18. Laguerre G. Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations / G. Laguerre, S. I. Masurier, N. Amarger // FEMS Microb. Ecol. - 1992. - V. 10. - P. 17-26.
19. Laguerre G. 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 / G. Laguerre, P. Mavingui, M-R. Allard [et al.] // Appl. Env. Microbiol. - 1996. - V. 62. - P. 2029-2036.
20. Laguerre G. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts / G. Laguerre, S. M. Nour, V. Macheret [et al.] // Microbiology. - 2001. - V. 147. - P. 981-993.
21. Lei X. Diverse bacteria isolated from root nodules of wild *Vicia* species in temperate region of China / X. Lei, E. T. Wang, W. F. Chen [et al.] // Arch. Microbiol. - 2008. - V. 190. - P. 657-671.
22. López-Guerrero M. G. *Rhizobium etli* taxonomy revised with novel genomic data and analyses / M. G. López-Guerrero, E. Ormeño-Orrillo, E. Velázquez [et al.] // Syst. Appl. Microbiol. - 2012. - V. 35. - P. 353-358.
23. Martínez-Romero E. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* beans and *Leucaena* sp. trees / E. Martínez-Romero, L. Segovia, F. M. Mercante [et al.] // Internat. J. Syst. Bacteriol. - 1991. - V. 41. - P. 417-426.
24. Moxley J. C. N₂ fixation and competitiveness of *Rhizobium phaseoli* strains isolated from Ontario soils / J. C. Moxley, D. J. Hume, D. L. Smith // Canadian J. Plant Science. - 1986. - V. 66. - P. 825-836.
25. Normand P. Analysis of a ribosomal operon in the actinomycete *Frankia* / P. Normand, B. Cournoyer, S. Nazaret, P. Simonet // Gene. - 1992. - V. 111. - P. 119-124.
26. Palmer K. M. Higher Diversity of *R. leguminosarum* bv. *viciae* Populations in Arable Soils than in Grass Soils / K. M. Palmer, J. P. W. Young // App. Env. Microbiol. - 2000. - V. 66. - P. 2445-2450.
27. Rosselló-Mora R. DNA-DNA reassociation methods applied to microbial taxonomy and their critical evaluation / R. Rosselló-Mora // In: Stackebrandt, E. (Ed.), Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes, Springer, Heidelberg, - 2006. - P. 23-50.
28. Segovia L. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains in a new species, *Rhizobium etli* sp. nov. / L. Segovia, J. P. W. Young, E. Martínez-Romero // Int. J. Syst. Bacteriol. - 1993. - V. 43. - P. 374-377.
29. Sessitsch A. Classification of Austrian rhizobia and the Mexican isolate FL27 obtained from *Phaseolus vulgaris* L. as *Rhizobium gallicum* / A. Sessitsch, H. Ramirez-Saad, G. Hardarson [et al.] // Int. J. Syst. Bacteriol. - 1997. - V. 47. - P. 1097-1101.
30. Silva C. *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* Nodulate Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) in a Traditionally Managed Milpa Plot in Mexico: Population Genetics and Biogeographic Implications / C. Silva, P. Vinuesa, L. E. Eguiarte, E. M. Romero, V. Souza // Appl. Env. Microbiol. - 2003. - V. 69. - P. 884-893.
31. Singh S. P. Breeding for seed yield / S. P. Singh // In: A. van Schoonhoven, O. Voysest, (eds). Common Beans Research for Crop Improvement. Cali: CAB International and CIAT, - 1991. - P. 338-443.
32. Singh S. P. Integrated genetic improvement / S. P. Singh // In: S. P. Singh (Ed.), Common bean improvement in the twenty first century. Developments in plant breeding, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, - 1999. - V. - P. 133-165.
33. Stackebrandt E. Report of the ad hoc committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology / E. Stackebrandt, W. Frederiksen, G. M. Garrity [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2002. - V. 52. - P. 1043-1047.
34. Suominen L. Identification and structure of the *Rhizobium galegae* common nodulation genes: evidence for horizontal gene transfer / L. Suominen, C. Roos, G. Lortet [et al.] // Mol. Biol. Evol. - 2001. - V. 18. - P. 907-916.
35. Ueda T. Phylogeny of Sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a *nodC* segment / T. Ueda, Y. Suga, N. Yahiro, T. Matsuguchi // J. Bacteriol. - 1995. - V. 177. - P. 468-472.
36. S. M. Barns, D. A. Pelletier, D. J. Lane // J. Bacteriol. - 1991. - V. 173. - P. 697-703. Valsangiacomo C. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies / C. Valsangiacomo, F. Baggi, V. Gaia [et al.] // J. Clin. Microbiol. - 1995. - V. 33. - P. 1716-1719.
37. van Berkum P. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia / P. van Berkum, Z. Terfeferowk, L. Paulin [et al.] // J. Bacteriol. - 2003. - V. 185. - P. 2988-2998.
38. Vinuesa P. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands / P. Vinuesa, C. Silva, M. J. Lorite [et al.] // Syst. Appl. Microbiol. - 2005. - V. 28. - P. 702-716.
39. Wang J. C. DNA topoisomerases / J. C. Wang // Annu. Rev. Biochem. - 1996. - V. 65. - P. 635-692.
40. Weisburg W. G. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study / W. G. Weisburg, S. M. Barns, D. A. Pelletier, D. J. Lane // J. Bacteriol. - 1991. - V. 173. - P. 697-703.
41. Yamamoto S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains / S. Yamamoto, S. Harayama // Appl. Env. Microbiol. - 1995. - V. 61. - P. 1104-1109.
42. Yamamoto S. Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products / S. Yamamoto, S. Harayama // Int. J. Syst. Bacteriol. - 1996. - V. 46. - P. 506-511.
43. Yamamoto S. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization / S. Yamamoto, P. J. Bouvet, S. Harayama // Int. J. Syst. Bacteriol. - 1999. - V. 49. - P. 87-95.
44. Young J. P. W. The evolution of specificity in the legume-*Rhizobium symbiosis* / J. P. W. Young, A. W. B. Johnston // Trends Ecol. Evol. - 1989. - V. 4. - P. 341-349.
45. Zézé A. Direct amplification of *nodD* from community DNA reveals the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* in soil / A. Zézé, L. A. Mutch, J. P. W. Young // Envi. Microbiol. - 2001. - V. 3. - P. 363-370.

УДК 579.841.3

Зотов В.С., Пунина Н.В., Хапчаєва С.А., Дідович С.В., Топунов А.Ф. ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ saAFLP І *hin*-РЕГІОН ПЛР ДЛЯ ГЕНОТИПУВАННЯ ШТАМІВ РИЗОБІЙ - СИМБІОНТІВ *PHASEOLUS VULGARIS*.

Для вивчення генетичного різноманіття симбіонтів квасолі (*Phaseolus vulgaris*) були запропоновані техніки saAFLP і *hin*-регіон ПЛР, що дозволяють вивчати різноманіття представників роду *Rhizobium* на рівні виду - групи штамів. У якості референсного підходу було вивчено нуклеотидний поліморфізм гену 16S рибосомальної РНК, межгенного регіону 16-23S ррнк, симбіотичних генів *nod* і *nif*-К, а також хромосомного гена гірази субодиниці Б-*gyr*.

Показано позитивну кореляцію між хромосомними маркерами та велику інформативність запропонованого нами *hin*-регіону. Таким чином, родоспецифічна ампліфікація на *hin*-регіон дозволяє більш ефективно описувати усередині- і міжвидове генетичне різноманіття бульбачкових бактерій роду *Rhizobium* симбіонтів квасолі та давати оцінку на перспективність використання їх у сільськогосподарській практиці.

Ключові слова: *Rhizobium*, *Phaseolus vulgaris*, філогенія, генетичне різноманіття, saAFLP, *hin*-регіон, 16S рРНК, 16S-23S рРНК, *nodD*, *nifD*, *nifK*, *gyrB*.

УДК 579.841.3

Зотов В.С., Пунина Н.В., Хапчаєва С.А., Дідович С.В., Топунов А.Ф. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ saAFLP И *hin*-РЕГИОН ПЦР ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ РИЗОБИЙ - СИМБИОНТОВ *PHASEOLUS VULGARIS*.

Для изучения генетического разнообразия симбионтов фасоли (*Phaseolus vulgaris*) были предложены техники saAFLP и *hin*-регион ПЦР, позволяющие изучать разнообразие представителей рода *Rhizobium* на уровне вида - группы штаммов. В качестве референсного подхода был изучен нуклеотидный полиморфизм гена 16S рибосомальной РНК, межгенного региона 16-23S рРНК, симбиотических генов *nodD* и

nifD-К, а также хромосомного гена гиразы субъединицы Б - *gyrB*.

Показана положительная корреляция между хромосомными маркерами и большая информативность предложенного нами *hin*-региона. Таким образом, родоспецифичная амплификация на *hin*-регион позволяет более эффективно описывать внутри- и межвидовое генетическое разнообразие клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* симбионтов фасоли и давать их оценку на перспективность использования в сельскохозяйственной практике.

Ключевые слова: *Rhizobium*, *Phaseolus vulgaris*, филогения, генетическое разнообразие, saAFLP, *hin*-регион, 16S рРНК, 16S-23S рРНК, *nodD*, *nifD*, *nifK*, *gyrB*.

UDK 579.841.3

Zotov V.S., Punina N.V., Khapchaeva S.A., Didovich S.V., Topunov A.F. USING OF saAFLP AND *hin*-REGION PCR FOR GENOTYPING ANALYSIS OF NODULATING RHIZOBIAL SYMBIONTS OF *PHASEOLUS VULGARIS*.

To investigate the genetic diversity of nodulating rhizobial symbionts of *Phaseolus vulgaris* we used saAFLP and *hin*-region PCR in this work. These methods allow to study the rhizobial genus diversity at the levels of species-group of stains.

The comparative analysis of 16S rRNA, *gyrB*, *nodD* genes, *nifD*-K gene and intergenic region, and 16S-23S rRNA intergenic region were used as reference comparative methods.

All results obtained by *hin*-region PCR were in a good agreement with the datas of previously described chromosomal markers (16S rRNA, *gyrB*). Also in this work we showed that *hin*-region was more informative marker in comparison with reference ones. Thus, *hin*-region PCR enables to investigate the inter- and intra-species genetic diversity of nodulating rhizobial symbionts of the common beans more efficiently. *Hin*-region PCR is a powerful method to estimate the perspective bacterial strain using in agricultural practice.

Key words: *Rhizobium*, *Phaseolus vulgaris*, phylogeny, genetic diversity, saAFLP, *hin*-region, 16S rRNA, 16S-23S rRNA, *nodD*, *nifD*, *nifK*, *gyrB*.