

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии
наук (УФИЦ РАН)**

**Институт биохимии и генетики – обособленное структурное
подразделение**

**Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Уфимского федерального исследовательского центра российской
академии наук (ИБГ УФИЦ РАН)**

На правах рукописи

КОРЯКОВ ИГОРЬ СЕРГЕЕВИЧ

**ИЗМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ
КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ В ХОДЕ ОНТОГЕНЕЗА БОБОВЫХ
РАСТЕНИЙ**

1.5.7 – Генетика

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

Уфа – 2023

Работа выполнена в лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов в Институте Биохимии и Генетики – обособленном структурном подразделении Федерального бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИБГ УФИЦ РАН).

Научный руководитель:	Баймиев Андрей Ханифович Доктор биологических наук, доцент.
Рецензенты:	Федяев Вадим Валентинович Кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии и биотехнологии ФГБОУ ВО Уфимского университета науки и технологий
	Ласточкина Оксана Владимировна Кандидат биологических наук, заведующая лабораторией молекулярных механизмов устойчивости растений к стрессам ИБГ УФИЦ РАН

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Взаимодействие между партнерами в симбиозе бобовых и клубеньковых бактерий происходит в несколько этапов, где активно участвуют как растительные, так и бактериальные составляющие. Бобовые растения, особенно многолетние в умеренном климате, проходят через повторяющиеся циклы взаимодействия с клубеньковыми бактериями в течение своего жизненного цикла. Сезонная цикличность также играет важную роль, поскольку в это время происходят циклы формирования и отмирания клубеньков. У клубеньковых бактерий эти циклы приводят к изменениям экологической ниши в системе “растение-почва”, где бактерии сталкиваются с различными факторами отбора.

Симбиотические гены бактерий являются основным генетическим элементом в процессе бобово-ризобияльного взаимодействия и во многом определяют специфичность и успешность этого симбиоза. У ризобий в сапрофитной стадии часто происходит утрата симбиотических генов как ненужного генетического материала для существования в этих условиях. Постоянные циклы утраты и приобретения *sut*-генов, связанные с "инфекцией и высвобождением", требуют от клубеньковых бактерий высокого уровня адаптивности.

Цель работы- исследование роли бобового растения в формировании генетического разнообразия своих микросимбионтов на разных стадиях своего развития.

Задачи:

1. Исследовать полиморфизм и филогению ризобий, выделенных из клубеньков многолетних дикорастущих бобовых растений, собранных на разных стадиях их вегетации.
2. Провести филогенетический анализ симбиотических генов полученных бактерий.

3. Определить азотфиксирующую активность выделенных штаммов клубеньковых бактерий.

4. Провести анализ рекомбинационной активности штаммов клубеньковых бактерий и оценить влияние на данный процесс микрофлоры почвы.

Актуальность темы исследования.

Исследования бобово-ризобиального симбиоза являются активно развивающимся направлением современной биологии с ярко выраженными прикладными и фундаментальными аспектами. Это связано, с одной стороны, с сельскохозяйственным значением симбиотической фиксации азота и необходимостью разработки генетических методов селекции и создания хозяйственно ценных штаммов ризобий, интродукция которых позволит получать высокие урожаи бобовых культур без применения дорогих и экологически опасных азотных удобрений. Кроме того, бобово-ризобиальную систему можно использовать в качестве модельной для изучения фундаментальных аспектов биологии взаимодействия микроорганизмов и растений, генетического регулирования и эволюции симбиотических систем. Исследования в этой области могут способствовать лучшему пониманию механизмов взаимодействия между растениями и микроорганизмами, а также разработке новых методов управления симбиозом для повышения его эффективности и устойчивости.

Материалы и методы

Объектом исследования служили клубеньковые бактерии многолетних дикорастущих бобовых растений полученные на разных стадиях их вегетации.

Основные методы исследования включали в себя: выделение тотальной ДНК бактерий, RAPD- анализ, ПДРФ-анализ, полимеразную цепную реакцию, электрофоретическое разделение продуктов ПЦР в агарозных и полиакриламидных гелях, секвенирование по Сэнгеру, выращивание

бобовых растений *invitro*, определение азотфиксирующей активности бактерий методом газовой хроматографии, статистический анализ данных.

Результаты и обсуждение

В ходе работы выделили 1186 изолятов бактерий дикорастущих многолетних бобовых растений на разных стадиях их вегетации. Для определения генетического полиморфизма бактерий, образующих клубеньки на корнях исследуемых растений, был использован метод RAPD.

Из результатов исследования выяснилось (рис. 1), что бактерии, полученные из клубеньков, собранных весной на начальной стадии вегетации растений, имеют более высокий уровень разнообразия. Далее в ходе развития макросимбионта разнообразие бактерий уменьшается. Однако при подготовке к зимнему покою растения активно формируют клубеньки на основе более широкого диапазона микросимбионтов.

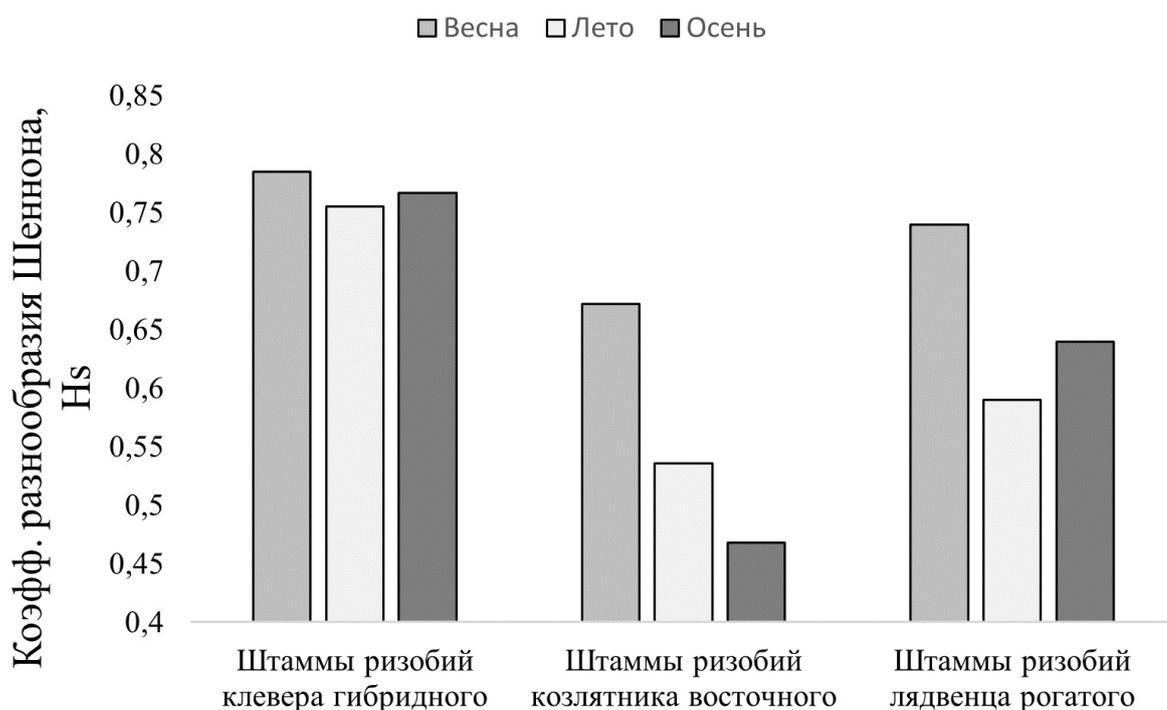


Рис. 1. Диаграмма изменения гетерогенности штаммов клубеньковых бактерий в зависимости от стадии вегетации растения-хозяина.

Также необходимо отметить, что в этот период, в частности, у лядвенца в клубеньках кроме ризобий выявляются микроорганизмы, не относящиеся к группе клубеньковых бактерий, например принадлежащие к роду *Pseudomonas*, что говорит о снижении специфичности взаимодействия бактерий с растениями.

Участие растения в выборе своих микросимбионтов вполне вероятно, и поскольку это происходит постоянно в ходе всего вегетационного периода, когда растение претерпевает значительные физиолого-морфологические изменения, это непременно сказывается на специфичности образования симбиоза. В начале вегетации есть потребность в активном минеральном питании и в этот период клубеньки образуются более активными с точки зрения азотфиксации штаммами. В середине жизненного цикла растению необходимо поддерживать баланс между минеральным питанием и обеспечением клубеньков питательными веществами. В конце же вегетации бобовые подготавливают на следующий сезон своих микросимбионтов путем амплификации их в клубеньках, которые при разрушении будут выделять в ризосферу потенциальных микросимбионтов и доноров симбиотических генов.

Высокий полиморфизм характерен в основном для клубеньковых бактерий аборигенных бобовых растений Южного Урала, у которых в течение длительного времени формировался большой пул легко обменивающихся генетической информацией штаммов микросимбионтов. Интродуцированные растения представляют из себя исключения. Так, например ризобии козлятника, вероятно ограничены в возможности рекомбинации с другими бактериями, что приводит к отсутствию у них высокого полиморфизма. Хотя разнообразие штаммов ризобий козлятника на Северном Кавказе, являющемся центром их происхождения, намного выше.

С целью определения видового состава бактерий был проведён ПДРФ анализ гена *16S* рРНК для выявления филогенетически однородных групп. Затем у отобранных из каждой группы образцов были секвенированы *16S*

pРНК и *recA*, а также для выяснения филогении симбиотических генов внутри групп клубеньковых бактерий нами были проанализированы нуклеотидные последовательности генов *nodC* и *nifH*, которые кодируют белки, участвующие в формировании азотфиксирующего симбиоза и ответственные за процесс фиксации азота.

В результате проведенного исследования было установлено, что все выделенные штаммы бактерий из клубеньков лядвенца рогатого как на основании сравнительного анализа гена *16S* pРНК, так и *recA* принадлежат к роду *Mesorhizobium* (рис. 4). Было обнаружено, что бактерии образуют две филогенетические группы: одна из них родственна *M. Loti*/*M. ciceri*, а другая отличается от них. Наибольшую схожесть с образующими отдельную кладу бактериями имеет *M. amorphae*, но процент ее гомологии с ними менее 97%, что не позволяет их отнести к этому виду. Представители второй группы могут принадлежать к неизвестному на данный момент виду рода *Mesorhizobium* и требуют дополнительного изучения.

Консервативная часть генома бактерий полученных из клубеньков лядвенца рогатого оказалась высоковариативной что говорит о большом филогенетическом разнообразии, однако почти все из ризобий содержат симбиотические гены характерные для *Mesorhizobiumloti* за исключением «осенних» микросимбионтов из группы *Mesorhizobium* sp. LotOs 1.10 у которых последовательность гена *nodC* оказалась очень схожей с последовательностями гена *nodC* описанными у бактерий *M. temperatum*, хотя *nifH* имеет сходство с соответствующим геном *M. Loti*.

Внутри бактерий, выделенных из клубеньков гибридного вида клевера, были обнаружены 7 филогенетических групп, принадлежащих к виду *Rhizobiumleguminosarum*, согласно анализу последовательностей генов, использованных для сравнения. В то время как бактерии, выделенные с клубеньками восточного козлятника, показали высокую степень гомологии по сравнению с другими видами *Rhizobium*, анализ последовательности гена *16Sp*РНК выявил 8 филогенетических вариантов, которые, несмотря на

небольшие различия в последовательностях, были отнесены к *Neorhizobiumgalegae* на основе анализа *recA*.

Для выявления отличий по степени эффективности штаммов клубеньковых бактерий, нами было проведено исследование их азотфиксирующей активности. В анализ были взяты по 10 штаммов, которые были выделены из клубеньков, собранных в каждый из периодов развития всех трех видов.

Так, азотфиксирующая эффективность бактерий люцерны рогатой, полученных из клубеньков, собранных в весенний период, в среднем составляет 14,11 мкг N₂/растение/ч, из «летних» клубеньков - 9,59 мкг N₂/растение/ч, а из «осенних» - 8,19 мкг N₂/растение/ч. Для ризобий клевера гибридного данные показатели равны 20,61; 14,94; 16,16 мкг N₂/растение/ч соответственно. А для микроорганизмов козлятника восточного – 19,76; 18,40; 21,24 N₂/растение/ч. При рассмотрении изолятов по отдельности обнаруживается любопытная закономерность. Бактерии, полученные из «весенних» клубеньков, характеризуются высоким разбросом по азотфиксирующей активности. Так, у люцерны рогатой верхние и нижние показатели составляют 37,7 и 3,17 мкг N₂/растение/ч, соответственно. Микроорганизмы же, полученные из «летних» клубеньков, демонстрируют более выравненные значения. Подобное явление характерно и для ризобий других исследованных растений. А вот изоляты, выделенные из «осенних» клубеньков начинают расходиться по этим параметрам. Очевидно, что растения при взаимодействии со значительным разнообразием штаммов клубеньковых бактерий в начале вегетации реализуют шанс отобрать для себя наиболее подходящие варианты микроорганизмов (рис. 2).

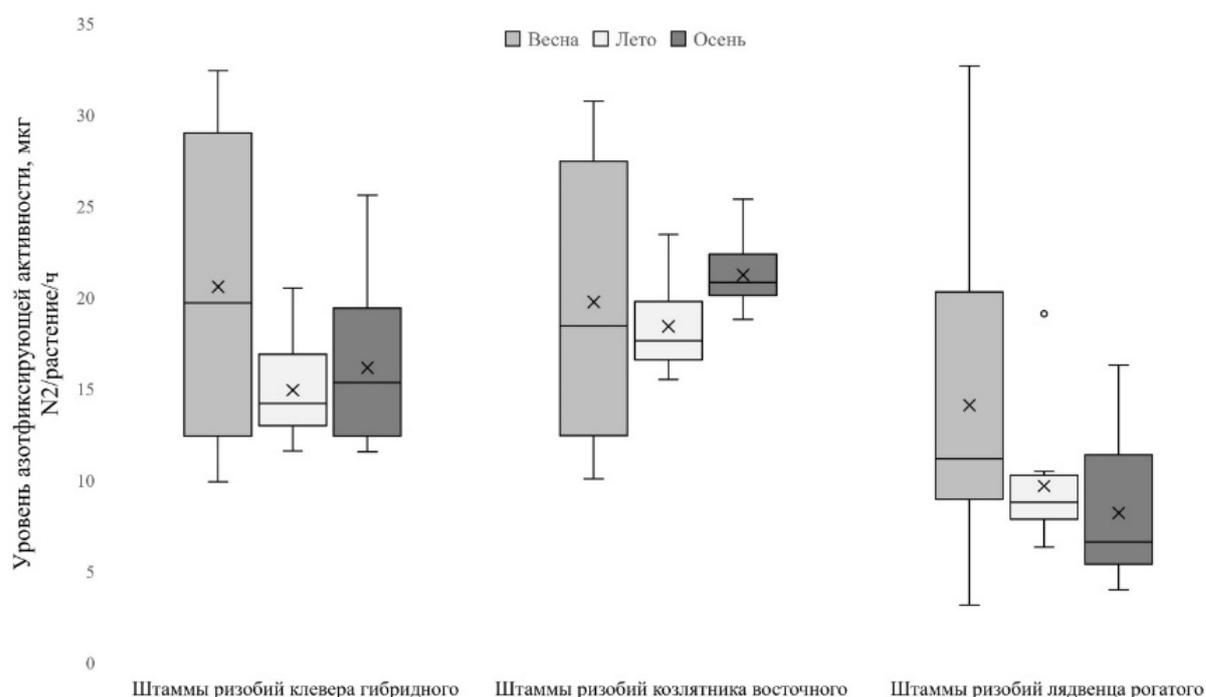


Рис. 2. Визуализация вариаций методом Тюки «коробка с усами». Уровень азотфиксирующей активности штаммов ризобий, полученных из клубеньков, собранных на разных стадиях вегетации растений. Показаны значения в пересчете на одно инокулированное растение.

Для проверки влияния микробиома почвы на генетическую изменчивость исследуемых штаммов клубеньковых бактерий была выбрана почва без специфичных для фасоли штаммов клубеньковых бактерий, но с присутствующими в ней ризобиями образующими симбиоз с клевером гибридным, мышиным горошком, горохом посевным и некоторыми другими бобовыми, вступающими в симбиоз с бактериями вида *Rhizobium leguminosarum*. Данную почву инокулировали штаммами клубеньковых бактерий фасоли PVu2 и St4, которые были получены ранее из клубеньков фасоли обыкновенной и посадили в нее стерильные семена фасоли. Также опыт повторили с инкубацией инокулированных бактерий в течение 30 суток при комнатной температуре, а затем уже сажали семена. При достижении растениями фасоли стадии 4 листа с них были собраны клубеньки и выделены чистые культуры бактерий. После чего в результате RAPD-анализа было выяснено что у многих штаммов подвергшимся

инкубации с аборигенной почвенной микробиотой возникли определенные изменения по сравнению с исходными вариантами, которыми была инокулирована почва.

При посеве инокулированных семян в стерильный песок и в почву без инкубации, исходные штаммы ризобий образовывали клубеньки гомогенным пулом бактерий, идентичным исходному штамму, что свидетельствует об отсутствии рекомбинационных процессов у бактерий и сохранении генома в исходном состоянии. Напротив, при предварительной инкубации исследуемых бактерий в почве в присутствии других биоваров *R. leguminosarum* клубеньки у фасоли формируются генетически гетерогенными вариантами ризобий, хотя и являющиеся производными штамма Pvu2, что свидетельствует о высоких уровнях рекомбинации у привнесенного штамма вероятно с участием горизонтального переноса генов.

Затем, используя аналогичную почву, мы провели опыт, в котором рассмотрели влияние другого бобового растения на рекомбинационную активность привнесенных штаммов бактерий. Для этого в инокулированную почву вначале были высажены стерильные семена гороха посевного, который образует клубеньки с аборигенными штаммами *Rhizobiumleguminosarum* из используемой в работе почвы, но не вступает в симбиоз с штаммами, специфичными к фасоли обыкновенной. После прорастания гороха на стадии 4-го листа проростки были срезаны на уровне почвы и в их корневую систему были посажены стерилизованные семена фасоли обыкновенной. Таким образом мы старались достичь наибольшего соприкосновения ризосферы гороха и вновь посаженной фасоли. Через месяц с корней фасоли были собраны клубеньки и выделены чистые культуры ризобий. С полученными изолятами также был проведен сравнительный RAPD-анализ. Было выявлено, что генетические изменения в варианте с пророщенным горохом относительно исходных штаммов оказались незначительными и инкубация исследуемых штаммов в почве в течении месяца влияет на рекомбинацию больше.

При посадке семян фасоли в корневую систему гороха, у которого перед этим была удалена надземная часть, было установлено, что клубеньки фасоли формируются более однородным набором бактерий, чем при посадке в инокулированную с бактериями почву после инкубации. Это может быть связано с тем, что горох способен активировать только определенный пул ризобий, которые более эффективно образуют клубеньки на корнях фасоли, что и приводит к отсутствию полиморфизма у образовавшихся клубеньков бактерий.

Для определения влияния активных веществ, выделяемых корнями при прорастании семени, на рекомбинантную активность клубеньковых бактерий стерилизованные семена проращивались в дистиллированной воде до появления зеленых ростков, затем отбирался остаток жидкости в стерильные пробирки. В культуру клеток *Rhizobium leguminosarum* добавляли полученную жидкость в двух пропорциях 10 мл корневого экссудата и 100 или 200 мкл среды с бактериями и культивировали 5 суток. Стерилизованные семена фасоли обрабатывали полученной культурой и высаживали в стерильный песок, после 30 дневного проращивания собирали клубеньки с корней фасоли и выделяли чистые культуры ризобий. Генетические RAPD профили полученных изолятов сравнивали с исходным штаммом *Rhizobium*.

Было установлено, что корневая секреция также влияет на генетическую рекомбинационную активность клубеньковых бактерий, причем степень изменения структуры генома зависит от инкубации бактерий с корневыми секретами растения. При этом прослеживается зависимость от концентрации корневых выделений в культуре бактерий. Природа воздействия их на рекомбинационные процессы у ризобий пока остается неясными.

В ходе выполнения работы было выявлено, что штаммы клубеньковых бактерий обладают ярко выраженной конкуренцией между штаммами, что приводило в ходе опытов к образованию клубеньков только одним из штаммов бактерий. Так, например, при инокуляции фасоли двумя штаммами

бактерий несмотря на то, что количество бактерий обоих штаммов было одинаковым, клубеньки были образованы только производными штамма Pvu2. Штамм St4 не образовал клубеньков.

Таким образом, было показано, что ризобии рода *Rhizobium* активно вовлечены в рекомбинационные процессы, приводящие к перестройке их геномов. Наибольшее влияние на данный процесс скорее всего имеет микробиом почвы, в котором наблюдается наибольшая частота изменения структуры генома у ризобий и предположительно в этом участвует горизонтальный перенос генов. Растения также могут влиять на гетерогенность клубеньковых бактерий. Так было показано, что растение гороха в своей ризосфере активировало определенный пул ризобий, который и формировал клубеньки на растении фасоли, посаженной в корневую систему гороха.

ВЫВОДЫ

1. Показана разная степень гетерогенности бактерий в клубеньках бобовых растений на разных стадиях их развития. Выявлена закономерность уменьшения полиморфизма бактерий в клубеньках к середине вегетации растений.

2. Филогенетический анализ клубеньковых бактерий, собранных из клубеньков растений на разных стадиях вегетации показал высокую однородность симбиотических генов у микросимбионтов одного вида растения вне зависимости от его фазы роста. При этом по коровой части генома наблюдались некоторые филогенетические различия микроорганизмов, преимущественно у микросимбионтов растений на начальной и конечной стадии вегетации.

3. Анализ азотфиксирующей активности выделенных штаммов клубеньковых бактерий показал, что наибольшие значения наблюдаются у микросимбионтов, полученных из «весенних» клубеньков, для них же характерен наибольший разброс в значениях азотфиксации. У бактерий из «летних» клубеньков наблюдается более выравненные показатели

нитрогеназной активности и отсутствие сверхэффективных вариантов, что говорит о произошедшем отборе наиболее оптимальных вариантов по эффективности клубеньков растением-хозяином.

4. Показано усиление рекомбинационной активности привнесенных штаммов клубеньковых бактерий аборигенной микрофлорой почвы, приводящая к образованию новых штаммов.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Зависимость состава клубеньковых бактерий лядвенца рогатого (*Lotus Corniculatus*) от стадии вегетации растения-хозяина / А. Х. Баймиев, Е. С. Акимова, И. С. Коряков [и др.] // Микробиология. – 2022. – Т. 91. – № 5. – С. 586-596

2. Baymiev An. et al. Regularities of the genotype's distribution of phylogenetically homogenous bacteria *Rhizobium leguminosarum* in the nodules of separate populations of *Lathyrus vernus* (spring pea) plants // *Biomics*. - 2021. - Т. 13 - №. 1 – С. 100-105

3. Коряков И.С., Акимова Е.С., Владимирова А.А., Баймиев Ан. Х. Изменение азотфиксирующей активности ризобий в клубеньках в зависимости от стадии вегетации растения-хозяина // VII Пущинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», школа-конференция для молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие». - 2021. - С. 59-60.

4. Акимова Е.С., Коряков И.С., Баймиев Ан.Х. Стратегия выбора клубеньковых бактерий многолетними бобовыми растениями в зависимости от стадии их вегетации // Вторая Международная научная конференция PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего». – 2020. – С. 12-12.

5. Баймиев Ан.Х., Владимирова А.А., Акимова Е.С., Коряков И.С., Баймиев Ал.Х. Высокая активность горизонтального переноса генов у

клубеньковых бактерий как стратегия взаимодействия с бобовыми растениями // Вторая Международная научная конференция PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего». – 2020. – С. 38-38.

6. Сравнительный анализ состава и эффективности микросимбионтов козлятника восточного и клевера гибридного на разных стадиях их вегетации / Е. С. Акимова, И. С. Коряков, А. А. Владимирова, А. Х. Баймиев // Сохранение и преумножение генетических ресурсов микроорганизмов : Сборник тезисов II Всероссийской школы-конференции, Санкт-Петербург, 26–27 июня 2023 года. – Москва: Издательство "Перо", 2023. – С. 19. – EDN SSDFNC.