

**ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ МИКРОСИМБИОНТОВ  
КОПЕЕЧНИКА ЩЕТИНИСТОГО *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum*,  
ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО В ПРИБАЙКАЛЬЕ\*****А.Л. САЗАНОВА, И.Г. КУЗНЕЦОВА, В.И. САФРОНОВА, А.А. БЕЛИМОВ,  
Ж.П. ПОПОВА, Н.Ю. ТИХОМИРОВА, Ю.С. ОСЛЕДКИН**

Одна из актуальных задач современной микробиологии и биотехнологии состоит в изучении механизмов взаимодействия бобовых растений с клубеньковыми бактериями (ризобиями) — обширной группой микроорганизмов, способных вступать в азотфиксирующий симбиоз с растением-хозяином. Знание этих механизмов необходимо для проведения научно обоснованной селекции высокоэффективных бобово-ризобияльных систем. Для понимания эволюции специфичности растительно-микробных взаимоотношений особое значение имеют симбиотические системы с участием реликтовых бобовых растений, представляющих собой промежуточное звено между исчезнувшими и современными видами. К таким уникальным объектам относится плейстоценовый реликт — копеечник щетинистый *Hedysarum gmelinii* Ledeb. subsp. *setigerum* (Turcz. ex Fischer et Mey.) Kurbatsky, произрастающий в Прибайкальском регионе. В представленной работе получена первая в мире коллекция микросимбионтов копеечника щетинистого. Изучение таксономического положения 19 полученных изолятов проводили с помощью RFLP-анализа ITS региона (ITS-RFLP) и секвенирования гена 16S рРНК (*rrs*). Филогенетический анализ микросимбионтов копеечника щетинистого показал их значительное генетическое разнообразие. Четырнадцать ризобияльных изолятов принадлежали к трем родам: *Rhizobium* (сем. *Rhizobiaceae*), *Phyllobacterium* (сем. *Phyllobacteriaceae*) и *Bosea* (сем. *Bradyrhizobiaceae*). В клубеньках копеечника щетинистого присутствовали несимбиотические ризобияльные виды, представители которых самостоятельно не формируют симбиоз с бобовыми растениями (*Phyllobacterium endophyticum*, *Phyllobacterium loti* и *Bosea* sp.). Кроме того, были выделены 5 изолятов, не являющихся клубеньковыми бактериями и относящихся к родам *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas* и *Agromyces*. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что реликтовые бобово-ризобияльные симбиозы, формируемые, в частности, копеечником щетинистым, представляют собой прообраз современных симбиотических систем и отражают пути эволюции в направлении рекрутирования симбиотических генов разных микроорганизмов и повышения специфичности растительно-микробных взаимоотношений. Штаммы несимбиотических ризобияльных видов, возможно, присутствуют в клубеньках как носители генов, не участвующих непосредственно в формировании симбиоза, но влияющих на его активность. Такие штаммы после соответствующего генетического и фенотипического изучения могут быть использованы для производства биопрепаратов с повышенной эффективностью симбиотической азотфиксации.

**Ключевые слова:** бобовые растения Прибайкалья, копеечник щетинистый *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum*, систематика ризобий, секвенирование генов рибосомальных РНК.

Ризобии — обширная, генетически разнородная группа граммотрицательных микроорганизмов, обитающих в почве, способных вступать во внутриклеточный симбиоз с бобовыми растениями и осуществлять фиксацию атмосферного азота, образуя на корнях растений-хозяев клубеньки, из-за которых эти микроорганизмы известны также как клубеньковые бактерии. Изучение механизмов (в том числе молекулярных), обеспечивающих взаимодействие бобовых растений с ризобиями, считается одной из актуальных задач современной микробиологии и биотехнологии и необходимо для проведения научно обоснованной селекции высокоэффективных растительно-микробных систем (1). Для понимания эволюции специфических растительно-микробных взаимодействий особое значение имеют симбиотические системы с участием реликтовых бобовых растений, представляющих собой промежуточное звено между исчезнувшими и современными видами. К таким уникальным объектам относится копеечник щетини-

\* Работа выполнена в рамках Программы ФАНО России по развитию и инвентаризации биоресурсных коллекций научными организациями (№ ИСГЗ 0664-2016-0018). Секвенирование гена ITS региона микросимбионтов выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-16-00080).

стый *Hedysarum gmelinii* Ledeb. subsp. *setigerum* (Turcz. ex Fischer et Mey.) Kurbatsky, произрастающий в Байкальском регионе (2). Ботанико-географический анализ показал принадлежность этого вида к плейстоценовым петрофитно-степным реликтам южносибирского происхождения (3, 4).

В литературе имеются данные о том, что из клубеньков копеечника колючейшего (*Hedysarum spinosissimum* subsp. *capitatum*) и некоторых других видов этого рода (*H. pallidum*, *H. carnosum*), произрастающих в Средиземноморском регионе, выделяются бактерии, принадлежащие к классу *Gamma*proteobacteria, — *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter cloacae*, *Leclercia adecarboxylata*, *Escherichia vulneris* и *Pseudomonas* sp. (5). Копеечник венечный *H. coronarium* нодулируется штаммами *Rhizobium sul-lae* (6). По данным китайских исследователей (7), из клубеньков видов копеечника *H. scoparium* и *H. polybotrys*, произрастающих на северо-западе Китая, выделяются представители рода *Rhizobium*. В 2011 году было показано, что растения копеечника альпийского *H. alpinum* нодулируется представителями рода *Mesorhizobium* (8).

Микросимбионты копеечника щетинистого ранее никогда не выделялись. В настоящей работе мы создали и описали первую в мире коллекцию ризобияльных микросимбионтов этого реликтового бобового растения, произрастающего в Прибайкальском регионе.

Цель нашей работы состояла в выделении микросимбионтов *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum* и определении таксономического положения штаммов с помощью ITS-RFLP метода и секвенирования последовательностей 16S рДНК.

*Методика.* Объектом исследования были 19 штаммов, изолированных с помощью традиционной методики (9) из корневых клубеньков копеечника щетинистого, произрастающего на мысе Зундук (материковое побережье байкальского пролива Малое море, координаты 53.383333, 107.41666753°23'00" с.ш. 107°25'00" в.д.). Микроорганизмы выращивали на модифицированном маннитно-дрожжевом агаре YMSA с добавлением 0,5 % янтарной кислоты (10) при 28 °С. Все изоляты депонированы в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) и размещены на Станции низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов (Liconic Instruments, Лихтенштейн) (11). Информация о штаммах доступна в Интернет-базе данных ВКСМ (12).

При первичной оценке внутривидового разнообразия штаммов проводили RFLP (restriction fragment length polymorphism) анализ последовательности между генами 16S и 23S рРНК (ITS-RFLP метод). Для этого амплифицированный фрагмент ДНК обрабатывали рестриктазой MspI («Promega», США) и разделяли рестрицированные ДНК-фрагменты электрофорезом в стандартном режиме (13). Для определения видовой принадлежности штаммов использовали нуклеотидную последовательность гена 16S рРНК (*rrs*).

Для амплификации ITS региона (800 п.н.) использовали праймеры FGPS1490-72 (5'-TGCGGCTGGATCCCCTCCTT-3') и FGPL-132 (5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3'), для амплификации 16S рДНК (около 1500 п.н.) — праймеры fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). Полученный ПЦП-продукт выделяли из геля и очищали (14) для последующего RFLP-анализа или секвенирования на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xl («Applied Biosystems», США). Поиск гомологичных последовательностей выполняли с помощью базы данных NCBI GenBank и программы BLAST (15). Для конструирования

ния филогенетического дерева применяли программу MEGA5 и метод Neighbor-Joining (16). Пары последовательностей сравнивали по числу различающихся нуклеотидов. Для оценки уровней поддержки кластеров был проведен бутстреп-анализ на основе 1000 повторов. Полученные последовательности депонированы в базе данных GenBank под номерами KY290459-KY290467, KY290469, KY290470 и KY290472-KY290474.

**Результаты.** Изоляты, относящиеся к клубеньковым бактериям, представлены в таблицах 1 и 2.

**1. Гомология (%) гена 16S рНК у быстрорастущих изолятов, выделенных из клубеньков копеечника щетинистого *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum* в Прибайкальском регионе, и у типовых штаммов родов *Phyllobacterium* и *Rhizobium***

| Типовой штамм | Изолят               |       |                 |        |        |                         |        |                            |        |        |        |
|---------------|----------------------|-------|-----------------|--------|--------|-------------------------|--------|----------------------------|--------|--------|--------|
|               | <i>Rhizobium</i> sp. |       | <i>Ph. loti</i> |        |        | <i>Ph. endophyticum</i> |        | <i>Phyllobacterium</i> sp. |        |        |        |
|               | Hse-26               | Hse-9 | Hse-19          | Hse-30 | Hse-10 | Hse-24                  | Hse-13 | Hse-14                     | Hse-17 | Hse-20 | Hse-29 |
| 1             | 95,7                 | 98,3  | 98,3            | 98,2   | 97,4   | 97,1                    | 99,9   | 96,9                       | 98,6   | 98,3   | 98,7   |
| 2             | 94,5                 | 99,6  | 99,6            | 99,5   | 97,9   | 97,7                    | 99,6   | 97,4                       | 98,9   | 99,7   | 98,9   |
| 3             | 94,9                 | 99,1  | 99,1            | 99,0   | 97,1   | 96,8                    | 99,9   | 96,6                       | 98,1   | 99,2   | 98,1   |
| 4             | 94,6                 | 98,6  | 98,6            | 98,6   | 96,6   | 97,1                    | 99,2   | 96,1                       | 97,7   | 98,6   | 97,7   |
| 5             | 94,3                 | 98,6  | 98,1            | 98,6   | 99,9   | 99,6                    | 99,4   | 99,3                       | 98,8   | 98,6   | 98,9   |
| 6             | 95,1                 | 98,5  | 98,6            | 98,4   | 98,5   | 98,2                    | 99,6   | 98,0                       | 99,3   | 98,6   | 99,3   |
| 7             | 95,1                 | 99,8  | 99,8            | 99,8   | 98,5   | 98,3                    | 99,6   | 98,0                       | 99,0   | 99,8   | 99,1   |
| 8             | 98,9                 | 94,4  | 94,4            | 94,3   | 93,5   | 93,3                    | 95,0   | 93,1                       | 94,8   | 94,4   | 94,8   |
| 9             | 96,4                 | 93,5  | 93,5            | 93,5   | 92,5   | 92,3                    | 93,4   | 92,2                       | 93,8   | 93,6   | 93,8   |

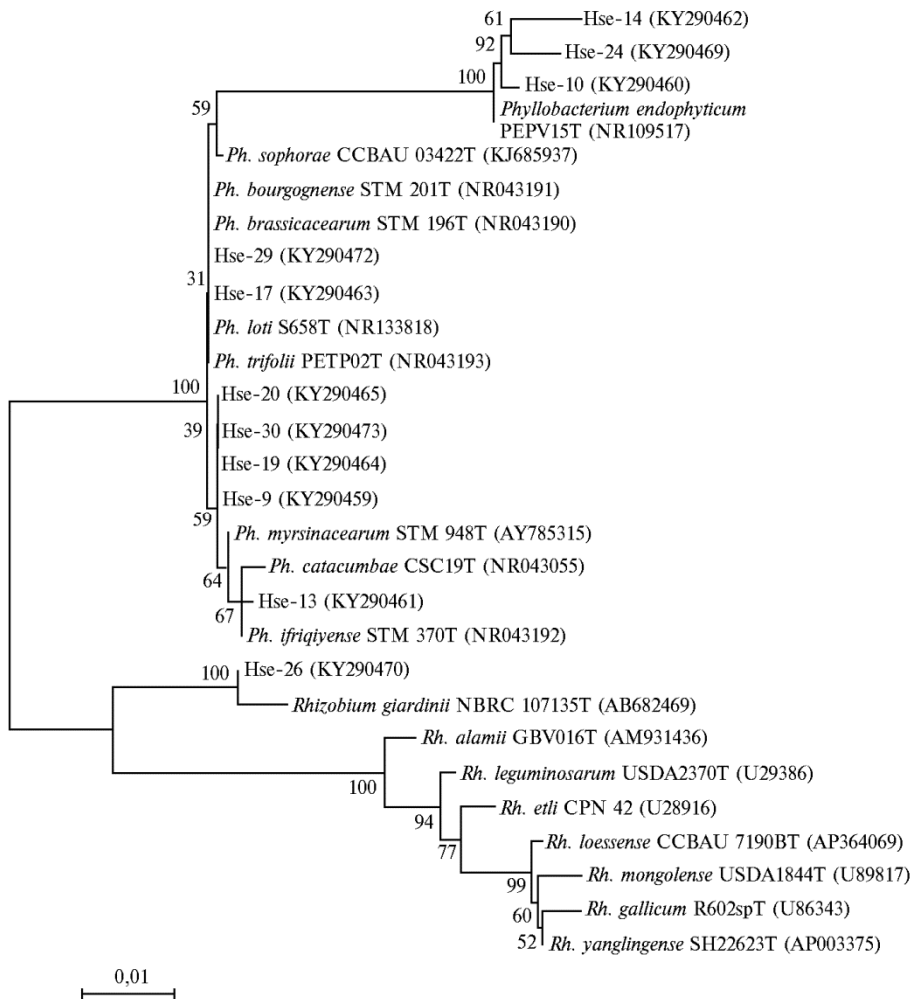
Примечание. 1 — *Ph. myrsinacearum* STM 948T, 2 — *Ph. trifolii* ПЕТР02Т, 3 — *Ph. ifriqiense* STM 370Т, 4 — *Ph. catacumbae* CSC19Т, 5 — *Ph. endophyticum* РЕРV15Т, 6 — *Ph. brassicacearum* STM 196Т, 7 — *Ph. loti* S658Т, 8 — *Rh. giardinii* NBRC 107135, 9 — *Rh. alamii* GBV016Т.

**2. Гомология (%) гена 16S рНК у медленно растущих изолятов, выделенных из клубеньков копеечника щетинистого *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum* в Прибайкальском регионе, и у типовых штаммов рода *Bosea***

| Типовой штамм                 | Изолят <i>Bosea</i> sp. |        |        |
|-------------------------------|-------------------------|--------|--------|
|                               | Hse-21                  | Hse-22 | Hse-32 |
| <i>B. vaviloviae</i> Vaf-18Т  | 98,5                    | 98,0   | 98,5   |
| <i>B. massiliensis</i> 63287Т | 98,4                    | 97,5   | 98,4   |
| <i>B. eneeae</i> 34614Т       | 98,6                    | 97,7   | 98,6   |
| <i>B. vestrisii</i> 34635Т    | 98,6                    | 97,7   | 98,6   |

По скорости роста все исследованные изоляты разделились на две группы: у трех штаммов видимые колонии образовывались на среде YMSA на 4-5-е сут, у остальных — на 3-и сут. Поскольку каждый изолят генерировал уникальный ITS-RFLP профиль (данные не приведены), все исследуемые штаммы стали объектом идентификации с помощью секвенирования гена *rrs*.

Анализ последовательности, показал, что 11 быстрорастущих штаммов принадлежат к родам *Phyllobacterium* и *Rhizobium* и формируют 3 статистически достоверно различающиеся кластера с уровнем поддержки 100 % (рис. 1). Первый кластер включал штаммы Hse-14, Hse-24 и Hse-10, а также типовой штамм *Ph. endophyticum* РЕРV15Т. Штаммы Hse-24 и Hse-10 были идентифицированы как *Ph. endophyticum*, показав высокую гомологию гена *rrs* с таковым у типового штамма РЕРV15Т (соответственно 99,6 и 99,9 %). Штамм Hse-14 был описан как *Phyllobacterium* sp. (табл. 1). Второй кластер объединил штаммы Hse-29, Hse-17, Hse-20, Hse-30, Hse-19, Hse-9, Hse-13 и типовые штаммы *Ph. sophorae* ССВАU03422Т, *Ph. bourgognense* STM201Т, *Ph. brassicacearum* STM 196Т, *Ph. loti* S658Т, *Ph. trifolii* ПЕТР02Т, *Ph. catacumbae* CSC19Т, *Ph. myrsinacearum* STM 948Т и *Ph. ifriqiense* STM 370Т (рис. 1). Штамм Hse-20 идентифицировали как *Phyllobacterium* sp., поскольку по гену *rrs* он был наиболее близок к двум видам



**Рис. 1.** *rrs*-Филограмма быстрорастущих штаммов, выделенных из клубеньков копеечника щетинолистного *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum* в Прибайкальском регионе, а также представителей родственных видов *Phyllobacterium* и *Rhizobium*. Полученные изоляты обозначены как Hse, типовые штаммы отмечены литерой «Т».

(степень гомологии с типовыми штаммами *Ph. trifolii* PEP02T и *Ph. loti* S658T составляла соответственно 99,7 % и 99,8 %). Степень сходства гена *rrs* у штаммов Hse-9, Hse-19 и Hse-30 и типового штамма *Ph. loti* S658T достигала 99,8 %. На этом основании перечисленные штаммы были описаны как *Ph. loti* (см. табл. 1). Наиболее близким к изолятам *Phyllobacterium* sp. Hse-17 и Hse-29 оказался типовой штамм *Ph. brassicacearum* STM 196T (99,3 % гомологии по гену *rrs*). Изолят Hse-13 показал 99,9 % сходства с двумя типовыми штаммами *Ph. myrsinacearum* STM 948T и *Ph. ifriqiyense* STM 370T, поэтому был идентифицирован только до рода — *Phyllobacterium* sp. (см. табл. 1). Третий кластер сформировали штамм Hse-26 и типовой штамм *Rhizobium giardinii* NBRC 107135. На основании результатов секвенирования гена *rrs* (см. табл. 1) изолят Hse-26 был идентифицирован как *Rhizobium* sp. (степень сходства с типовым штаммом *Rhizobium giardinii* NBRC 107135 — 98,9 %).

На рисунке 2 представлена *rrs*-филограмма, отражающая таксономическое положение трех медленно растущих ризобийных изолятов в пределах семейства *Bradyrhizobiaceae*. По гену *rrs* штаммы Hse-21 и Hse-32

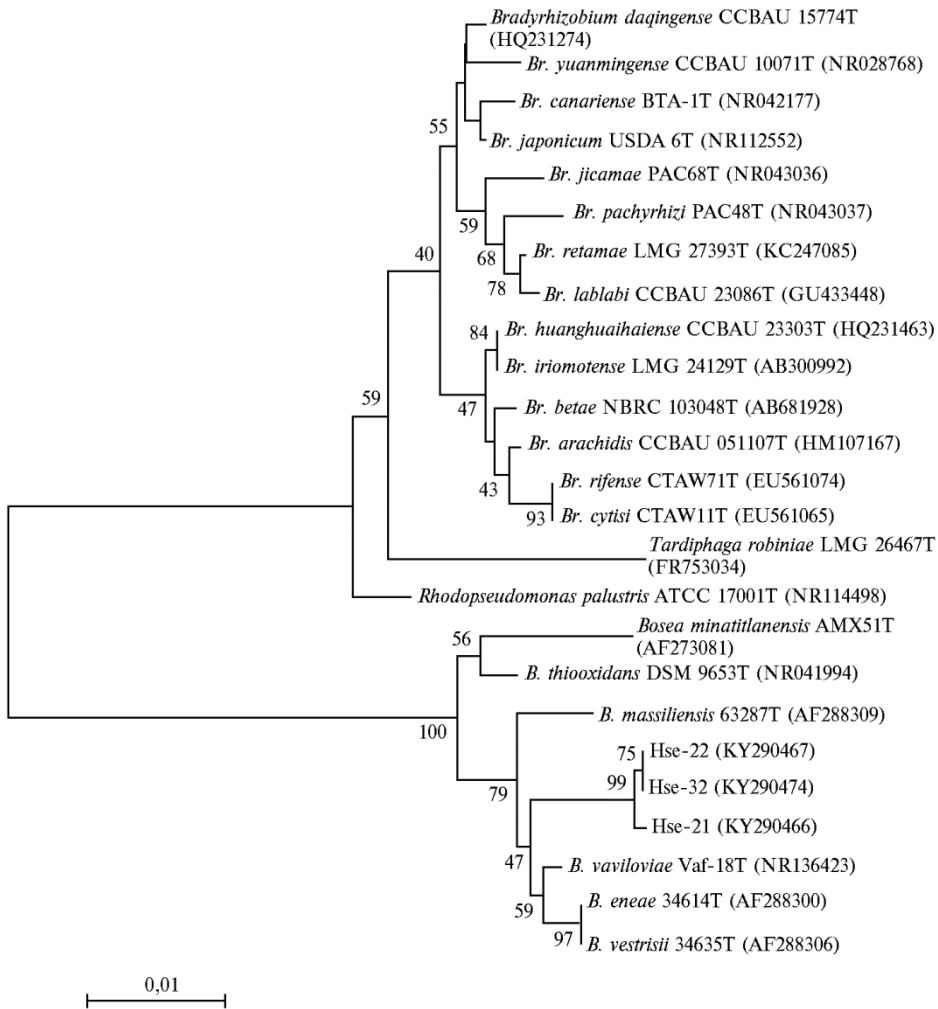


Рис. 2. *rrs*-Филограмма медленнорастущих штаммов, выделенных из клубеньков копеечника щетинистого *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum* в Прибайкальском регионе, а также представителей родственных видов *Bosea*. Полученные изоляты обозначены как Hse, типовые штаммы отмечены литерой «Т».

показали 98,5 % гомологии с типовым штаммом *Bosea vaviloviae* Vaf-18T и 98,6 % — с типовыми штаммами *B. eneae* 34614T и *B. vestrisii* 34635T (см. табл. 2). Сходство по гену *rrs* у изолята Hse-22 и наиболее близкого типового штамма *B. vaviloviae* Vaf-18T составляло 98,0 % (см. табл. 2). На этом основании штаммы Hse-21, Hse-22 и Hse-32 были идентифицированы как *Bosea* sp. Следует отметить, что вид *B. vaviloviae* описан совсем недавно (в 2015 году) для трех штаммов-микросимбионтов реликтового бобового растения *Vavilovia formosa*, произрастающего в Северной Осетии (10). Кроме того, из клубеньков других видов копеечника, произрастающих в Средиземноморье, северо-западных районах Китая и средней полосе России, микроорганизмы родов *Bosea* и *Phyllobacterium* не выделялись (5-8).

Способность каких-либо представителей рода *Bosea* формировать азотфиксирующий симбиоз ранее не подтверждалась, хотя штаммы четырех видов (*B. lupini*, *B. lathyri*, *B. robiniae* и *B. vaviloviae*) были изолированы из клубеньков бобовых растений соответственно родов *Lupinus*, *Lathyrus*, *Robinia* и *Vavilovia* (10, 17). Однако по крайней мере два вида рода *Phyllobacterium* (*Ph. sophorae* и *Ph. trifolii*) описаны как эффективные микросимбионты рас-

тений *Sophorae flavescens* (18), *Trifolium repens* и *Lupinus albus* (19). Поэтому байкальские изоляты, принадлежащие роду *Bosea* и имеющие высокую степень сходства с видом *B. vaviloviae*, а также бактерии рода *Phyllobacterium* представляют большой интерес для дальнейшего изучения.

Анализ последовательностей гена *rrs* у пяти неризобийных изолятов, выделенных из клубеньков копеечника щетинистого, показал их принадлежность к родам *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas* и *Agromyces* (данные не приведены). Бактерии рода *Stenotrophomonas* были изолированы и из других бобовых растений Байкальского региона (20). По данным литературы, представители этих родов могут присутствовать в клубеньках бобовых, а также быть обитателями ризосферы и филлосферы различных видов растений (21-25).

Таким образом, в настоящей работе мы впервые получили коллекцию штаммов, изолированных из реликтового бобового растения копеечника щетинистого *Hedysarum gmelinii* Ledeb. subsp. *setigerum*, произрастающего в Байкальском регионе. В результате нашего исследования было показано, что среди микросимбионтов этого растения встречаются штаммы симбиотических видов клубеньковых бактерий (*Rhizobium* sp.), а также нетипичные виды, представители которых не формируют симбиоз (*Phyllobacterium endophyticum*, *Ph. loti* и *Bosea* sp.). Штаммы несимбиотических ризобийных видов, возможно, присутствуют в клубеньках как носители генов, не участвующих непосредственно в формировании симбиоза, но влияющих на его эффективность. Дальнейшее фенотипическое и генетическое исследование выделенных микроорганизмов может внести существенный вклад в понимание путей эволюции и становления растительно-микробных взаимодействий в бобово-ризобийной системе.

*Авторы благодарят А.В. Верхоzinу (СИФИБР СО РАН) за помощь в организации экспедиции в Прибайкальский регион.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Тихонович И.А., Борисов А.Ю., Цыганов В.Е. Интеграция генетических систем растений и микроорганизмов при симбиозе. Успехи современной биологии, 2005, 125(3): 227-238.
2. Электронный каталог сосудистых растений Азиатской России. Режим доступа: <http://www-sbras.nsc.ru/win/elbib/atlas/flora/271.html>. Без даты.
3. Мулдашев А.А., Галеева А.Х., Маслова Н.В., Елизарьева О.А. О природоохранном статусе копеечника Гмелина *Hedysarum gmelinii* Ledeb. (*Fabaceae*) в Республике Башкортостан. Вестник Оренбургского государственного университета, 2009, 6: 254-257.
4. Куликов П.В. Конспект флоры Челябинской области (сосудистые растения). Екатеринбург, 2005.
5. Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A., Squartini A. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. Systematic and Applied Microbiology, 2004, 27(4): 462-468 (doi: 10.1078/0723202041438527).
6. Squartini A., Struffi P., Doring H., Selenska-Pobell S., Tola E., Giacomini A., Vendramin E., Velazquez E., Mateos P.F., Martinez-Molina E., Dazzo F.B., Casella S., Nuti M.P. *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly *Rhizobium hedysari*), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52: 1267-1276 (doi: 10.1099/00207713-52-4-1267).
7. Wei G.H., Zhang Z.X., Chen C., Chen W.M., Ju W.T. Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the legume genera *Astragalus*, *Lespedeza* and *Hedysarum* in northwestern China. Microbiological Research, 2008, 163(6): 651-662 (doi: 10.1016/j.micres.2006.09.005).
8. Сафронова В.И., Чижевская Е.П., Белимов А.А., Павлова Е.А. Определение таксономического положения штаммов-микросимбионтов копеечника (*Hedysarum*) и астрагала (*Astragalus*) путем анализа генов рибосомальных РНК. Сельскохозяйственная биология, 2011, 3: 61-64.

9. Novikova N., Safronova V. Transconjugants of *Agrobacterium radiobacter* harbouring *sym* genes of *Rhizobium galegae* can form an effective symbiosis with *Medicago sativa*. FEMS Microbiology Letters, 1992, 93: 261-268 (doi: 10.1016/0378-1097(92)90472-Z).
10. Safronova V.I., Kuznetsova I.G., Sazanova A.L., Kimeklis A.K., Belimov A.A., Andronov E.E., Pinaev A.G., Chizhevskaya E.P., Pukhaev A.R., Popov K.P., Willems A., Tikhonovich I.A. *Bosea vaviloviae* sp. nov., a new species of slow-growing rhizobia isolated from nodules of the relict species *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. Antonie van Leeuwenhoek, 2015, 107: 911-920 (doi: 10.1007/s10482-015-0383-9).
11. Safronova V., Tikhonovich I. Automated cryobank of microorganisms: Unique possibilities for long-term authorized depositing of commercial microbial strains. In: Microbes in applied research: current advances and challenges /A. Mendez-Vilas (ed.). World Scientific Publishing Co, Hackensack, 2012.
12. Электронная база данных Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ). Режим доступа: <http://www.arriam.spb.ru>. Без даты.
13. Румянцева М.Л., Симаров Б.В., Онищук О.П. Биологическое разнообразие клубеньковых бактерий в экосистемах и агроценозах. Теоретические основы и методы. СПб, 2011.
14. Stępkowski T., Żak M., Moulin L., Kryliczak J., Golińska B., Narozna D., Safronova V.I., Małdrzak C.J. *Bradyrhizobium canariense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the two dominant rhizobium species in root nodules of lupin and serradella plants growing in Europe. Systematic and Applied Microbiology, 2011, 34: 368-375 (doi: 10.1016/j.syapm.2011.03.002).
15. GenBank sequence database. The National Center for Biotechnology Information. Режим доступа: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Без даты.
16. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, evolutionary distance, and Maximum Parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28: 2731-2739 (doi: 10.1093/molbev/msr121).
17. De Meyer S.E., Willems A. Multilocus sequence analysis of *Bosea* species and description of *Bosea lupini* sp. nov., *Bosea lathyri* sp. nov. and *Bosea robiniae* sp. nov., isolated from legumes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62: 2505-2510 (doi: 10.1099/ijs.0.035477-0).
18. Jiao Y.S., Yan H., Ji Z.J., Liu Y.H., Sui X.H., Zhang X.X., Wang E.T., Chen W.X., Chen W.F. *Phyllobacterium sophorae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of *Sophora flavescens*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65: 399-406 (doi: 10.1099/ijs.0.067017-0).
19. Valverde A., Velázquez E., Fernández-Santos F., Vizcaino N., Rivas R., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Igual J.M., Willems A. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55: 1985-1989 (doi: 10.1099/ijs.0.63551-0).
20. Кузнецова И.Г., Сазанова А.Л., Сафронова В.И., Тихомирова Н.Ю., Оследкин Ю.С., Белимов А.А. Изучение генетического разнообразия микросимбионтов байкальских видов чины (*Lathyrus*), горошка (*Vicia*), остролодочника (*Oxytropis*) и астрагала (*Astragalus*). Сельскохозяйственная биология, 2015, 50: 345-352 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.3.345rus).
21. Cardoso J.D., Hungria M., Andrade D.S. Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93: 2035-2049 (doi: 10.1093/femsec/fix027).
22. Fterich A., Mahdhi M., Caviedes M.A., Pajuelo E., Rivas R., Rodriguez-Llorente I.D., Mars M. Characterization of root-nodulating bacteria associated to *Prosopis farcta* growing in the arid regions of Tunisia. Archives of Microbiology, 2011, 193(6): 385-397 (doi: 10.1007/s00203-011-0683-z).
23. Ezzakkioui F., El Mourabit N., Chahboune R., Castellano-Hinojosa A., Bedmar E.J., Barrijal S. Phenotypic and genetic characterization of rhizobia isolated from *Hedysarum flexuosum* in Northwest region of Morocco. Systematic and Applied Microbiology, 2014, 37(6): 457-465 (doi: 10.1016/j.syapm.2014.05.009).
24. Xu L., Zhang Y., Wang L., Chen W., Wei G. Diversity of endophytic bacteria associated with nodules of two indigenous legumes at different altitudes of the Qilian Mountains in China. Journal of Basic Microbiology, 2015, 55(7): 830-837 (doi: 10.1002/jobm.201400790).
25. Corretto E., Antonielli L., Sessitsch A., Compant S., Gorfer M., Kuffner M., Brader G. *Agromyces aureus* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Salix caprea* L. grown in a heavy-metal-contaminated soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(9): 3749-3754 (doi: 10.1099/ijsem.0.001260).

## STUDY OF THE GENETIC DIVERSITY OF MICROSymbionTS ISOLATED FROM *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum*, GROWING IN THE BAIKAL LAKE REGION

A.L. Sazanova, I.G. Kuznetsova, V.I. Safronova, A.A. Belimov, Zh.P. Popova,  
N.Yu. Tikhomirova, Yu.S. Osledkin

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Federal Agency of Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail v.safronova@rambler.ru (corresponding author)  
ORCID:

Sazanova A.L. orcid.org/0000-0003-0379-6975

Safronova V.I. orcid.org/0000-0003-4510-1772

Kuznetsova I.G. orcid.org/0000-0003-0260-7677

Belimov A.A. orcid.org/0000-0002-9936-8678

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

We thank A.V. Verkhovina (SIPPB SB RAS) for organizing the expedition to the Baikal Lake region.

Supported by the Federal Agency of Scientific Organizations (Program for the development and inventory of biore-source collections, № ISGZ 0664-2016-0018). ITS-sequencing of the isolates was supported by the Russian Science Foundation (grant 16-16-00080).

Received March 11, 2017

doi: 10.15389/agrobiol.2017.5.1004eng

### Abstract

One of the urgent problems of modern microbiology and biotechnology is the study of the mechanisms of interaction between leguminous plants and root nodule bacteria (rhizobia), which are an extensive group of microorganisms capable to form nitrogen-fixing symbiosis with a host plant. Knowledge of these mechanisms is necessary for carrying out scientifically based selection of highly effective rhizobia-legume symbiotic systems. To understand the evolution of the specificity of plant-microbe interactions, symbiotic systems with the participation of relic leguminous plants, which are an intermediate link between the extinct and modern species, are of particular importance. One of these unique objects is the pleistocene relic *Hedysarum gmelinii* Ledeb. subsp. *setigerum* (Turcz. ex Fischer et Mey.) Kurbatsky. The aim of this study was to isolate and identify the world's first collection of microsymbionts of this plant species growing in the Lake Baikal region. The study of taxonomic positions of 19 isolates from root nodules of *H. gmelinii* subsp. *setigerum* plants was conducted by the methods of ITS-RFLP and 16S rRNA gene (*rrs*) sequencing. Phylogenetic analysis revealed the considerable genetic diversity among microsymbionts of the plant species studied. Fourteen rhizobial isolates belonged to 3 genera: *Rhizobium* (family *Rhizobiaceae*), *Phyllobacterium* (family *Phyllobacteriaceae*) and *Bosea* (family *Bradyrhizobiaceae*). It was noted the presence in the root nodules of non-symbiotic rhizobial species that are not able to form symbiosis with leguminous plants (*Phyllobacterium endophyticum*, *Ph. loti* and *Bosea* sp.). In addition, five non-rhizobial isolates belonging to the genera *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas* и *Agromyces* were obtained. The obtained data may indicate that the relic rhizobia-legume symbioses, formed in particular by the *H. gmelinii* subsp. *setigerum* plants, are prototypes of modern symbiotic systems and reflect the evolutionary pathways in the direction of recruiting symbiotic genes of different microorganisms and increasing the specificity of plant-microbe interactions. It is possible that strains of non-symbiotic rhizobial species are present in nodules as a source of genes that do not participate directly in the formation of symbiosis, but affect its activity. Such strains, after appropriate genetic and phenotypic study, can be used for the production of biopreparations with increased efficacy.

Keywords: leguminous plants of the Baikal region, *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum*, ribosomal RNA genes sequences, *Rhizobiaceae* taxonomy.

---

### Научные собрания

#### 5th NANO TODAY CONFERENCE

(6-10 December, 2017, Hawaii, USA)

**Topics:** synthesis and self-assembly of nanocrystals, nanoparticles and thin films; functionalization and size-dependent properties of nanocrystals, quantum dots and nanowires; processing and templating of nanotubes and nanoporous materials; tailoring of polymeric nanoparticles, organic-inorganic nanocomposites and biohybrids; nanosystems for biological and medical applications; nanosystems for sensing, diagnostic, imaging, magnetic, electronic and structural applications; nanomaterials for energy and environmental applications.

**Information:** <https://www.elsevier.com/events/conferences/nano-today-conference>