

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 57.083.18+579.262+574.23

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРОСИМБИОНТОВ
БОБОВОГО *HEDYSARUM ARCTICUM* V. FEDTSCH,
ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО НА ОСТРОВЕ САМОЙЛОВСКИЙ
В ДЕЛЬТЕ РЕКИ ЛЕНЫ (АРКТИЧЕСКАЯ ЗОНА ЯКУТИИ)

© 2024 г. Д. С. Карлов^{a, *}, П. В. Гуро^a, И. Г. Кузнецова^a, А. Л. Сазанова^a, И. А. Алехина^b,
Н. Ю. Тихомирова^a, Н. Н. Лашинский^c, А. А. Белимов^a, В. И. Сафронова^a

^aВсероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, 196608, Россия

^bАрктический и антарктический научно-исследовательский институт, Санкт-Петербург, 199397, Россия

^cЦентральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, 630090, Россия

*e-mail: ds.karlov@arriam.ru

Поступила в редакцию 15.10.2023 г.

После доработки 08.11.2023 г.

Принято к публикации 10.11.2023 г.

Из клубеньков бобового растения Копеечник арктический (*Hedysarum arcticum* V. Fedtsch.), произрастающего на о. Самойловский в дельте реки Лена (Арктическая зона Якутии), выделены штаммы бактерий, отнесенных по результатам секвенирования *rrs*-гена к родам *Rhizobium* (сем. *Rhizobiaceae*) и *Mesorhizobium* (сем. *Phyllobacteriaceae*) из пор. *Hyphomicrobiales* (класс *Alphaproteobacteria*). Согласно данным филогенетического анализа конкатемеров генов *atpD*, *dnaK*, *gyrB* и *rpoB* штаммы принадлежат к видам *Rhizobium giardinii* и *Mesorhizobium norvegicum*. Показано, что полученные штаммы относятся к факультативным психротрофам, способным расти при 5 и 28°C. Выделенные микросимбионты перспективны для дальнейшего изучения их симбиотической эффективности в отношении других видов кормовых бобовых растений с целью создания высокопродуктивных агрофитоценозов в условиях Крайнего Севера.

Ключевые слова: Арктическая зона Якутии, клубеньковые бактерии, северные агрофитоценозы, *Hedysarum arcticum* V. Fedtsch

DOI: 10.31857/S0026365624030155

Формирование новых высокопродуктивных пастбищных и сенокосных агроценозов как кормовой базы для сельскохозяйственных животных является одной из важнейших стратегических задач освоения и устойчивого развития арктических территорий России (Стратегия развития ..., 2020). Клубеньковые бактерии (ризобии), вступая в симбиотические взаимоотношения с бобовыми растениями, способствуют фиксации атмосферного азота и обеспечивают растения доступными азотистыми соединениями, тем самым увеличивая продуктивность фито- и агроценозов (Andrews, Andrews, 2017). Создание многолетних агроценозов в экстремальных условиях Крайнего Севера эффективно только при использовании местных генотипов растений и бактериальных штаммов (Котелина и соавт., 1998). Многолетнее бобовое растение Копеечник арктический (*Hedysarum arcticum* V. Fedtsch.) является перспективным для внедрения в качестве компонента устойчивого бобово-злакового агрофитоценоза в арктических регионах России, благодаря

хорошим адаптационным способностям к суровым почвенно-климатическим условиям. В частности, показано, что естественные фитоценозы с доминированием *H. arcticum* обеспечивают высокую биологическую продуктивность в условиях Воркутинской тундры по сравнению с фитоценозами, основу которых составляют другие местные виды бобовых (Экологические основы ..., 1991). В то же время информация о микросимбионтах *H. arcticum*, судя по литературным данным, отсутствует.

Цель работы — выделение микросимбионтов из корневых клубеньков дикорастущего бобового растения *H. arcticum*, произрастающего на о. Самойловский в дельте реки Лена (Арктическая зона Якутии), изучение их генетического разнообразия и определение видовой принадлежности.

Бактериальные штаммы были выделены из клубеньков *H. arcticum* в условиях стерильного микровегетационного опыта. Для получения клубеньков были использованы семена *H. arcticum*

и надмерзлотный почвенный образец сезонно-тающего слоя (СТС), отобранный из глубины 57 см в районе произрастания бобового растения. Поверхность семян стерилизовали концентрированной H_2SO_4 в течение 5 мин, промывали стерильной водой и проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри при 4°C в темноте в течение 3 сут. Проростки помещали в стерильные стеклянные сосуды объемом 50 мл (по два на сосуд) с 3 г стерильного вермикулита в каждом. В сосуды добавляли по 6 мл питательного раствора (г/л): K_2HPO_4 — 1.0, KH_2PO_4 — 0.25, $MgSO_4$ — 1.0, $Ca_3(PO_4)_2$ — 0.2, $FeSO_4$ — 0.02, H_3BO_3 — 0.005, $(NH_4)_2MoO_4$ — 0.005, $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ — 0.005, $MnSO_4$ — 0.002 (Novikova, Safronova, 1992). Проростки инокулировали почвенной вытяжкой из образца СТС. Неинокулированные растения были использованы в качестве отрицательного контроля. Микроvegetационный опыт проводился в двукратной повторности. Растения выращивали в фитотроне при 18–22°C в течение 30 дней при относительной влажности 50% и 4-х уровневом режиме освещения/температуры: ночь (18°C, 8 ч), утро (200 мкмоль квантов $m^{-2} \cdot c^{-1}$, 20°C, 2 ч), день (400 мкмоль квантов $m^{-2} \cdot c^{-1}$, 23°C, 12 ч), вечер (200 мкмоль квантов $m^{-2} \cdot c^{-1}$, 20°C, 2 ч). Освещение осуществляли лампами L36W/77 FLUORA (“Osram”, Германия). Ризобияльные штаммы выделяли из гомогенизированных клубеньков по стандартной методике с использованием агаризованной маннито-дрожжевой питательной среды YMA при 28°C (Novikova, Safronova, 1992) после стерилизации клубеньков в течение 1 мин в 96%-ном этаноле.

Для получения чистых бактериальных культур видимые колонии отбирали и последовательно клонировали 2 раза на чашках Петри с плотной средой YMA методом истощающего штриха. Выделение гДНК из чистых культур осуществляли с помощью наборов DNeasy Blood&Tissue kit (“QIAGEN”, Германия). Первичная идентификация штаммов была проведена методом ПЦР с последующим секвенированием последовательностей маркерного гена 16S рРНК. Для амплификации была использована пара праймеров fD1 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' и rD1 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'. Уточнение видовой принадлежности полученных штаммов было проведено с помощью амплификации и секвенирования последовательностей генов *atpD*, *dnaK*, *gyrB* и *rpoB* с использованием праймеров и ПЦР-протоколов, описанных ранее (Weir et al., 2004; Martens et al., 2007; Safronova et al., 2017). Поиски близкородственных типовых штаммов и филогенетический анализ конкатемеров генов *rpoB*, *gyrB*, *atpD* и *dnaK* проводили с использованием программы BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Конструирование филогенетических деревьев осуществляли в программе MEGA X v. 10.2 (Kumar et al., 2018) с помощью метода наибольшего правдоподобия (Maximum Likelihood), в качестве показателя устойчивости использовали метод Bootstrap для 500 репликаций. Полученные

нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank под номерами OR673297, OR673298, OR689846-OR689848, OR777658-OR777661.

Всего из клубеньков *H. arcticum* было выделено два штамма, сформировавших колонии на 3 сут. Помимо роста при оптимальной температуре 28°C, штаммы показали способность к росту при 5°C с образованием колоний на 7–9 сут, что позволило рассматривать их как факультативных психротрофов. По результатам анализа *rrs*-гена штаммы 20/1–1 и 20/1–4 были отнесены, соответственно, к родам *Rhizobium* (сем. *Rhizobiaceae*) и *Mesorhizobium* (сем. *Phyllobacteriaceae*) порядка *Hyphomicrobiales* класса *Alphaproteobacteria*. Известно, что многие представители родов *Rhizobium* и *Mesorhizobium* способны вступать в симбиотические взаимоотношения с широким спектром видов дикорастущих пастбищных бобовых растений родов Вика (*Vicia*), Чина (*Lathyrus*), Астргал (*Astragalus*), Остролодка (*Oxytropis*) и Копеечник (*Hedysarum*) (Andrews, Andrews, 2017; Helene et al., 2019).

Штамм 20/1–1 показал близкое сходство *rrs*-гена (99.0, 99.22 и 99.62%) с тремя типовыми штаммами — *Rhizobium giardinii* H152^T, *Pararhizobium polonicum* F5.1^T и *R. herbae* CCBAU83011^T соответственно.

Штамм *R. giardinii* H152^T был выделен из клубенька Фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*), произрастающей во Франции (Amarger et al., 1997). Была показана способность штамма *R. giardinii* H152^T формировать неэффективные клубеньки на корнях растения-хозяина, а также на культурных бобовых Макропителиуме темно-пурпурном (*Macropitilium atropurpureum* (Moc. & Sessé ex DC.) Urb.) и Лейцене белоголовой (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit). Штамм *P. polonicum* F5.1^T был выделен из корончатого галла Вишни птичьей (*Prunus avium* (L.) L.), произрастающей в Польше, тогда как штамм *R. herbae* CCBAU83011^T — из клубенька Астргала перепончатого (*Astragalus membranaceus* (Fisch. ex Link) Bunge), произрастающего в умеренных регионах Китая (Zhao et al., 2008).

На *rrs*-дереве штамм 20/1–1 формировал со штаммами *R. giardinii* H152^T, *P. polonicum* F5.1^T и *R. herbae* CCBAU83011^T кластер со 100%-ным уровнем поддержки, тогда как на дереве конкатемеров генов *atpD*, *dnaK* и *rpoB* он группировался только со штаммом *R. giardinii* H152^T с высоким (84%-ным) уровнем поддержки (рис. 1 и 2). Таким образом, штамм 20/1–1 был отнесен к виду *R. giardinii*.

Штамм 20/1–4 имел 100%-е сходство гена *rrs* со штаммами *Mesorhizobium norvegicum* 10.2.2^T и *M. loti* NZP2213^T, выделенными из корневых клубеньков кормового бобового растения Лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L.), соответственно, в Норвегии (Kabdullayeva et al., 2020) и Новой Зеландии (Jarvis et al., 1982). Показано, что *M. loti* NZP2213^T способен формировать эффективный симбиоз

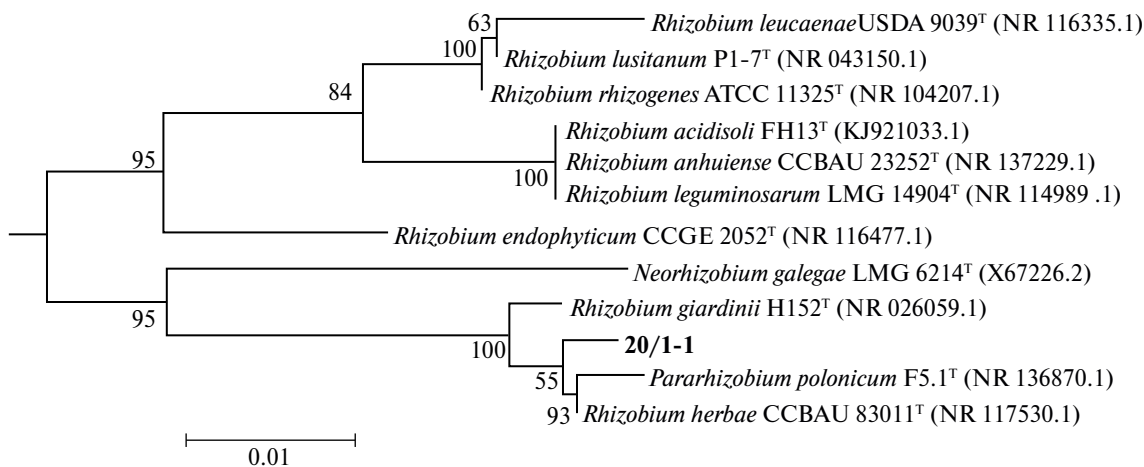


Рис. 1. Филогенетическое дерево представителей рода *Rhizobium*, построенное с использованием последовательностей гена 16S рРНК. Цифры (%) в узлах ветвления — достоверность по bootstrap-анализу 500 альтернативных деревьев.

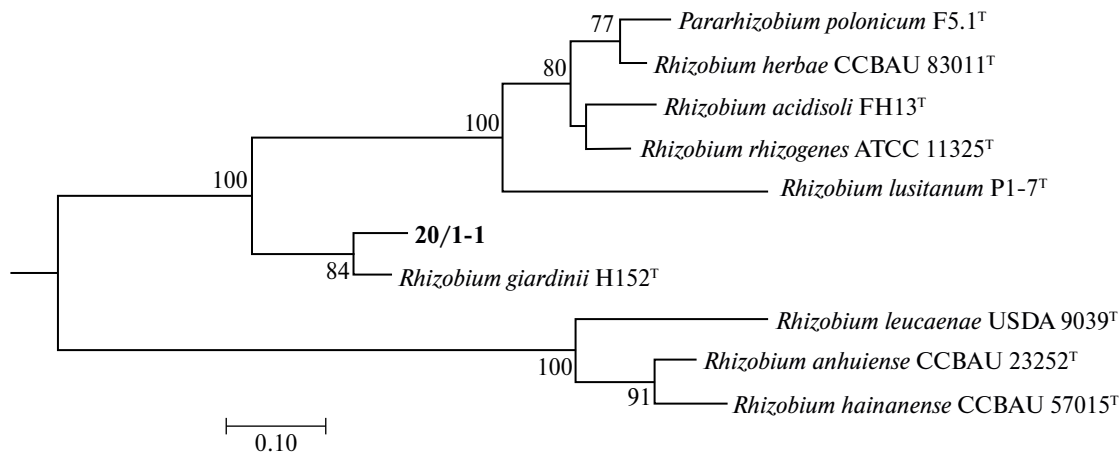


Рис. 2. Филогенетическое дерево представителей рода *Rhizobium*, построенное на основе конкатемеров генов *rpoB*, *atpD* и *dnaK*. Цифры (%) в узлах ветвления — достоверность по bootstrap-анализу 500 альтернативных деревьев.

с разными видами рода *Lotus*. На *rrs*-дереве штамм 20/1–4 формировал кластер со штаммами *M. qingshengii* CCBAU33460^T, *M. norvegicum* 10.2.2^T и *M. loti* NZP2213^T с 76% уровнем поддержки, тогда как на дереве, построенном на основе конкатемеров генов *atpD*, *dnaK*, *rpoB* и *gyrB*, он группировался на уровне 99%-ной поддержки со штаммами *M. norvegicum* 10.2.2^T и *M. loti* NZP2213^T (рис. 3 и 4).

Для определения его видовой принадлежности было дополнительно проведено сравнение сходства конкатемеров генов *atpD*, *dnaK*, *rpoB* и *gyrB* между изолятом 20/1–4 и штаммами *M. loti* NZP2213^T и *M. norvegicum* 10.2.2^T. Показано, что штамм 20/1–4 наиболее близок (99.93%-е сходство) к штамму *M. norvegicum* 10.2.2^T, тогда как сходство с *M. loti* NZP2213 составило 98.15% (табл. 1). На основании полученных результатов штамм 20/1–4 был отнесен к виду *M. norvegicum*.

Ранее авторами в условиях стерильного микро-vegetационного опыта была показана способность штамма 20/1–4 формировать азотфиксирующий

и неэффективный симбиоз с дикорастущими арктическими бобовыми *Oxytropis adamsiana* (Trautv.) Jurtzev и *Astragalus frigidus* (L.) A. Gray соответственно, тогда как способность штамма 20/1–1 образовывать клубеньки на корнях этих же видов бобовых выявлена не была (неопубликованные данные).

Таким образом, из клубеньков бобового растения *H. arcticum*, произрастающего на о.

Таблица 1. Сходство (%) штаммов 20/1–4, *Mesorhizobium loti* LMG 6125^T и *M. norvegicum* 10.2.2^T, оцененное путем сравнения конкатемеров генов *atpD*, *dnaK*, *rpoB* и *gyrB*

Штаммы	20/1–4	<i>M. loti</i> LMG 6125 ^T	<i>M. norvegicum</i> 10.2.2 ^T
20/1–4	100	98.15	99.93
<i>M. loti</i> LMG 6125 ^T	98.15	100	97.78
<i>M. norvegicum</i> 10.2.2 ^T	99.93	97.78	100

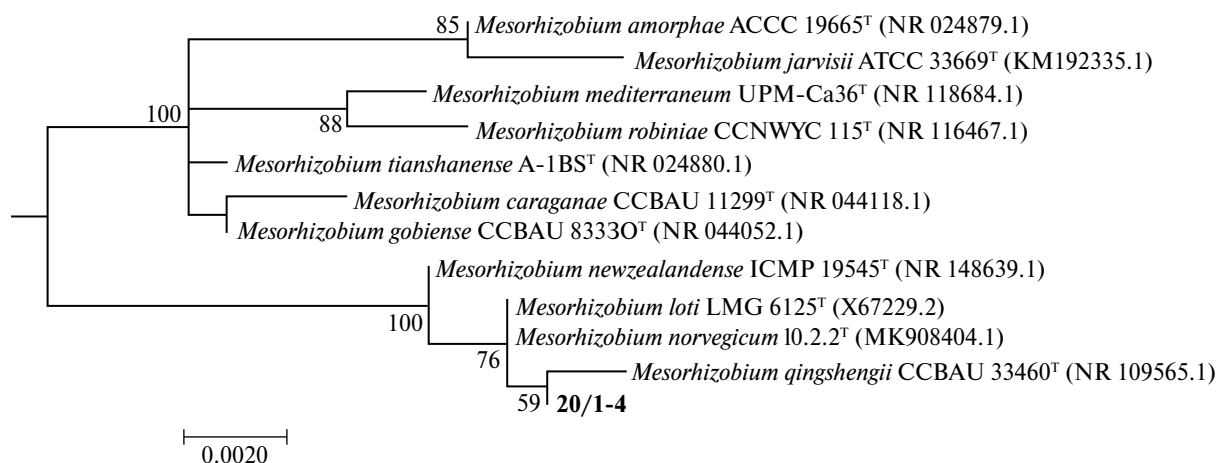


Рис. 3. Филогенетическое дерево представителей рода *Mesorhizobium*, построенное с использованием последовательностей гена 16S рРНК. Цифры (%) в узлах ветвления — достоверность по bootstrap-анализу 500 альтернативных деревьев.

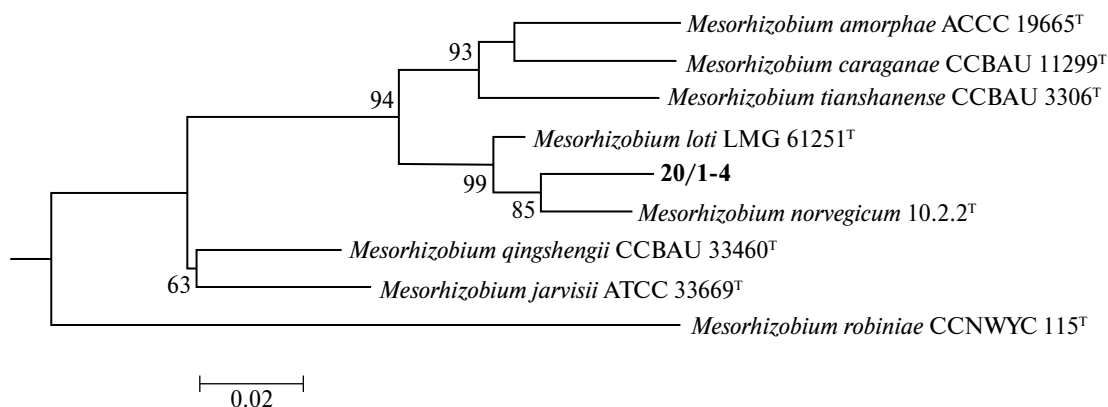


Рис. 4. Филогенетическое дерево представителей рода *Mesorhizobium*, построенное на основе конкатемеров генов *rpoB*, *gyrB*, *atpD* и *dnaK*. Цифры (%) в узлах ветвления — достоверность по bootstrap-анализу 500 альтернативных деревьев.

Самойловский в Арктической зоне Якутии, выделены два факультативно психротрофных штамма, отнесенные к родам *Rhizobium* и *Mesorhizobium* пор. *Hyphomicrobiales* (класс *Alphaproteobacteria*). При помощи анализа конкатемеров генов *atpD*, *dnaK*, *rpoB* и *gyrB*, а также построения на их основе филогенетических деревьев, штаммы 20/1–1 и 20/1–4 идентифицированы как *R. giardinii* и *M. norvegicum* соответственно. Они перспективны для дальнейшего изучения симбиотических взаимоотношений с разными видами кормовых бобовых растений в условиях микровегетационных опытов, а также для поисков целевых хозяйственно-ценных генов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования проведены при финансовой поддержке РНФ, проект № 20-76-10042-П.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Искренне благодарим О. Д. Большиянову, инженера отдела географии полярных стран Арктического и Антарктического научно-исследовательского института (С.-Петербург), за любезно предоставленные семена *H. arcticum* и почвенные образцы. Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ФГБНУ ВНИИСХМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Котелина Н. С., Арчегова И. Б., Романов Г. Г., Туруба-
нова Л. П. Особенности природопользования и пер-
спективы природовосстановления на Крайнем Севе-
ре России. Екатеринбург: УрО РАН, 1998. 148 с.
- Стратегия развития Арктической зоны Российской
Федерации и обеспечения национальной безопасно-
сти на период до 2035 года. Утверждена Указом Пре-
зидента РФ № 645 от 26 октября 2020 г. URL: [http://
kremlin.ru/acts/news/64274](http://kremlin.ru/acts/news/64274)
- Экологические основы управления продуктивностью
агрофитоценозов восточноевропейской тундры / Под
ред. Арчегова И. Б., Котелина Н. С., Грунина Л. К.
и др. Л.: Наука, 1991. 152 с.
- Amarger N., Macheret V., Laguerre G. *Rhizobium gallicum* sp.
nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris*
nodules // Int. J. Syst. Bacteriol. 1997. V. 47. P. 996–1006.
<https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-996>
- Andrews M., Andrews M. E. Specificity in legume-rhizobia
symbiosis // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. Art. 705.
<https://doi.org/10.3390/ijms18040705>
- Helene L. C. F., Dall'Agnol R. F., Delamuta J. R. M., Hungria M.
Mesorhizobium atlanticum sp. nov., a new nitrogen-fixing
species from soils of the Brazilian Atlantic Forest biome // Int.
J. Syst. Evol. Microbiol. 2019. V. 69. P. 1800–1806.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003397>
- Jarvis B. D. W., Pankhurst C. E., Patel J. J. *Rhizobium loti*,
a new species of legume root nodule bacteria // Int. J. Syst.
Evol. Microbiol. 1982. V. 32. P. 378–380.
<https://doi.org/10.1099/00207713-32-3-378>
- Kabdullayeva T., Crosbie D. B., Marín M. *Mesorhizobium*
norvegicum sp. nov., a rhizobium isolated from a *Lotus*
corniculatus root nodule in Norway // Int. J. Syst. Evol.
Microbiol. 2020. V. 70. P. 388–396.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003769>
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X:
Molecular Evolutionary Genetics Analysis across comput-
ing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Martens M., Delaere M., Coopman R., De Vos P., Gillis M.,
Willems A. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related
taxa // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. P. 489–503.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.64344-0>
- Novikova N., Safronova V. Transconjugants of *Agrobac-*
terium radiobacter harbouring *sym* genes of *Rhizobium*
galegae can form an effective symbiosis with *Medicago*
sativa // FEMS Microbiol. Lett. 1992. V. 93. P. 261–268.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05107.x>
- Safronova V. I., Kuznetsova I. G., Sazanova A. L. et al. *Mi-*
crovirga ossetica sp. nov., a species of rhizobia isolated
from root nodules of the legume species *Vicia alpestris* Ste-
ven // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 94–100.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001577>
- Weir B. S., Turner S. J., Silvester W. D., Park D.-C.,
Young J. M. *Mesorhizobium* strains and *Rhizobium leguminosa-*
rum nodulate native legume genera of New Zealand, while in-
troduced legume weeds are nodulated by *Bradyrhizobium* spe-
cies // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. P. 5980–5987.
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5980-5987.2004>
- Zhao C. T., Wang E. T., Chen W. F., Chen W. X. Diverse
genomic species and evidences of symbiotic gene lateral
transfer detected among the rhizobia associated with *As-*
tragalus species grown in the temperate regions of Chi-
na // FEMS Microbiol. Lett. 2008. V. 286. P. 263–273.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01282.x>

SHORT COMMUNICATIONS

Genetic Identification of Microsymbionts of the Legume *Hedysarum arcticum* B. Fedtsch, Growing on Samoylovsky Island in the Lena River Delta (Arctic Zone of Yakutia)

D. S. Karlov^{1, *}, P. V. Guro¹, I. G. Kuznetsova^{1, *}, A. L. Sazanova¹, I. A. Alekhina²,
N. Yu. Tikhomirova¹, N. N. Lashchinsky³, A. A. Belimov¹, and V. I. Safronova¹

¹All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St.-Petersburg, 196608, Russia

²Arctic and Antarctic Research Institute, St.-Petersburg, 199397, Russia

³Central Siberian Botanical Garden, 101, Novosibirsk, 630090, Russia

*e-mail: ds.karlov@arriam.ru

Received October 15, 2023; revised November 8, 2023; accepted November 10, 2023

Abstract—Bacterial strains isolated from root nodules of the legume plant *Hedysarum arcticum* B. Fedtsch growing on Samoylovsky Island in the Lena River delta (Arctic zone of Yakutia) were assigned to the genera *Rhizobium* (family *Rhizobiaceae*) and *Mesorhizobium* (*Phyllobacteriaceae*) of the order *Hyphomicrobiales* (class *Alphaproteobacteria*) according to the *rrs* gene sequencing data. According to phylogenetic analysis of *concatemers* of the *atpD*, *dnaK*, *gyrB*, and *rpoB* genes, the strains belonged to the species *Rhizobium giardinii* and *Mesorhizobium norvegicum*. The strains were shown to be facultative psychrotrophs growing at 5 and 28°C. These microsymbionts are promising for further study of their symbiotic efficiency regarding other forage legume species, with an aim to establish highly productive agrophytocenoses in the Far North.

Keywords: *Hedysarum arcticum* B. Fedtsch, Arctic Yakutia, rhizobial bacteria, northern agrophytocenoses