

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПОИСКА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ ШТАММОВ  
КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ИНОКУЛЯЦИИ  
БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ\***Ан.Х. БАЙМИЕВ <sup>✉</sup>, И.С. КОРЯКОВ, Е.С. АКимова, А.А. ВЛАДИМИРОВА,  
Р.Т. МАТНИЯЗОВ, Ал.Х. БАЙМИЕВ

Высокоэффективные штаммы клубеньковых бактерий служат основой микроудобрений, используемых при выращивании бобовых растений. Применяя искусственную инокуляцию ризобиями, можно добиться значительного повышения урожайности этих культур. Самый распространенный способ поиска высокоэффективных штаммов указанных микроорганизмов — их выделение из клубеньков самих растений с последующей селекцией штаммов, наиболее эффективно влияющих на урожайность культуры. В настоящей работе нами были проанализированы бактерии, полученные из клубеньков, собранных на разных этапах развития растений трех видов бобовых — лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L.), клевера гибридного (*Trifolium hybridum* L.), козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.). Показано, что каждое растение вступает в симбиоз только с одним определенным видом бактерии, но с большим числом его генетических вариантов, каждый из которых потенциально может обладать индивидуальными симбиотическими характеристиками. Наибольшее разнообразие штаммов было обнаружено в клубеньках клевера гибридного, а высокой однородностью характеризовались микросимбионты козлятника восточного. Было установлено, что в начале развития всех трех взятых в анализ видов растений клубеньки сформированы наиболее разнообразными штаммами ризобий, обладающими высоким разбросом значений азотфиксирующей активности: для микросимбионтов лядвенца рогатого — от 3,17 до 32,70  $N_2 \cdot \text{растение}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ , для микросимбионтов козлятника восточного — от 10,08 до 30,75  $N_2 \cdot \text{растение}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ , для микросимбионтов клевера гибридного — от 9,91 до 32,42  $N_2 \cdot \text{растение}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ , и среди них чаще, чем в другие периоды, встречаются высокоэффективные штаммы. В середине же вегетационного периода бактерии, которые образуют клубеньки на корнях исследуемых бобовых растений, имеют относительно выравненные значения эффективности фиксации азота (для микросимбионтов лядвенца рогатого — от 6,35 до 19,13  $N_2 \cdot \text{растение}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ , для микросимбионтов козлятника восточного — от 15,51 до 23,47  $N_2 \cdot \text{растение}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ , для микросимбионтов клевера гибридного — от 11,61 до 20,53  $N_2 \cdot \text{растение}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ ), и по величине эти показатели ниже максимальной активности, обнаруживаемой у штаммов в клубеньках в начале вегетации. В конце жизненного цикла клубеньки на корнях анализируемых растений сформированы микроорганизмами, которые с разной эффективностью фиксируют азот, но все же уступают по этому показателю наиболее активным «весенним» штаммам. Таким образом, мы полагаем, что поиск эффективных штаммов клубеньковых бактерий наиболее продуктивен на начальном этапе развития растения.

**Ключевые слова:** ризобии, бобовые растения, *Lotus corniculatus* L., лядвенец рогатый, *Trifolium hybridum* L., клевер гибридный, *Galega orientalis* Lam., козлятник восточный, фаза вегетации, азотфиксация, высокоэффективные штаммы.

Применение искусственной инокуляции клубеньковыми бактериями (ризобиями) при выращивании бобовых культур приводит к значительному увеличению урожайности этих растений. Впервые ризобии из корневых клубеньков бобовых выделил и затем получил в культуре нидерландский ученый М.В. Бейеринк (Martinus Willem Beijerinck, 16.03.1851-01.01.1931) в 1888 году, а первый биопрепарат на их основе был произведен в Германии в 1896 году под торговым названием нитрагин. В СССР первые партии этого удобрения были произведены в 1930-1935 годах (1). С тех пор для выращивания многих бобовых растений применяются различные биопрепараты, основу которых составляет штаммы клубеньковых бактерий. Поскольку ризобии обладают специфичностью по отношению к растению-хозяину, каждый препарат можно применять только на определенной культуре в зависимости от того, какой штамм бактерий в нем содержится (2-4).

\* Работа была выполнена с привлечением приборного парка ЦКП «Биомика» (отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК». Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект РНФ № 22-24-00207).

Для изготовления препаратов с использованием клубеньковых бактерий прежде всего необходимо выделить и подобрать производственный штамм ризобий, соответствующий бобовому растению определенного вида. Обычно бактерии выделяют непосредственно из клубенька: из крупного клубенька розового цвета, окрашенного леггемоглобином, извлекают небольшое количество растительной ткани и шпательом растирают ее по поверхности агара в чашке Петри. После определенных процедур селекции полученный штамм может быть использован для предпосевной инокуляции при выращивании культуры.

Со времени открытия клубеньковых бактерий проведены масштабные научные исследования принципов и генетических механизмов возникновения и функционирования бобово-ризобияльного симбиоза, выявлены и описаны участвующие в этом процессе компоненты как со стороны растения, так и со стороны бактерий (5-8). Так, теперь известно, что за образование симбиоза с растением у бактерий отвечают многочисленные гены, обозначаемые как *sym*-гены, продукты которых вовлечены в микробно-растительное взаимодействие на разных стадиях этого процесса. К *sym*-генам относятся ответственные за фиксацию азота *nif*-гены, кодирующие синтез и регуляцию фермента нитрогеназы, *nod*-гены, которые кодируют синтез Nod-факторов (НФ), отвечающих за инициацию и специфичность образуемого симбиоза, а также *fix*-гены, также необходимые для азотфиксации, которые часто сцеплены с *nif*-генами, но не гомологичны им (9, 10).

Известно, что ризобии обладают высокой пластичностью генома, которая связана с их рекомбинационной активностью и участием в интенсивном горизонтальном переносе генов. Вследствие этого в ризосфере растений образуется большое число различных штаммов клубеньковых бактерий, обладающих разными симбиотическими активностями (11). В зоне умеренного климата, где присутствует смена сезонов, бобовые растения каждый свой жизненный цикл начинают с выбора своих микросимбионтов, проводя их селекцию. В дикой природе этот выбор подчинен большому количеству различных факторов: эдафических, климатических, биологических и абиотических. В результате образуется мутуалистическое взаимодействие, эффективность которого соизмерима с уровнем возможности растения обеспечить в клубеньках фиксацию азота, что позволяет ему, в конечном счете, конкурировать с другими организмами и оставлять себе потомство. Это в итоге приводит к образованию симбиотического взаимодействия разной эффективности и соответственно к взаимодействию с клубеньковыми бактериями, обладающими разными симбиотическими характеристиками.

У дикорастущих бобовых растений симбиоз возникает со штаммами ризобий, имеющими разную азотфиксирующую активность. Но в сельском хозяйстве для получения высоких урожаев требуются наиболее эффективные варианты клубеньковых бактерий, способные максимально обеспечить растение фиксированным азотом. Следовательно, возникает необходимость отбора из большого количества штаммов, образующих клубеньки на корнях бобовых растений, тех вариантов, которые бы обладали наибольшей эффективностью и при предпосевной обработке в высоких концентрациях обеспечивали бы формирование азотфиксирующих клубеньков, образованных преимущественно ими, а не аборигенными вариантами ризобий. Эта проблема по сей день остается актуальной, поскольку складываются новые условия выращивания растений и появляются новые сорта, которые могут по-другому реагировать на штаммы бактерий, применявшиеся ранее для инокуляции.

В настоящей работе, сравнив азотфиксирующую активность клу-

беньков на разных стадиях развития растения у представителей трех видов бобовых, мы выявили ее различия. На этом основании впервые сформулировано предположение, что поиск штаммов клубеньковых бактерий с наибольшими азотфиксирующими возможностями целесообразнее вести на начальном этапе развития растения.

Цель работы заключалась в том, чтобы выяснить, в какой период вегетации растения поиск высокоэффективных штаммов клубеньковых бактерий будет наиболее продуктивным.

**Методика.** Симбиотические бактерии были выделены из клубеньков растений лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L.), клевера гибридного (*Trifolium hybridum* L.) и козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.). С каждого растения получили по 30 изолятов. Клубеньки собирали на разных стадиях вегетации растения-хозяина: весной (во время набухания почек, апрель-май), летом (в период формирования бутонов, июнь) и осенью (после закладки растениями почек на зиму с первыми заморозками). Клубеньковые бактерии изолировали методом пункций ткани клубенька из зоны размножения микроорганизмов с последующим рассевом до отдельных колоний на питательной среде YM (0,1 % дрожжевой экстракт, 1 % маннит, 0,05 %  $K_2HPO_4$ , 0,05 %  $MgSO_4$ , 0,01 NaCl, 1,5 % агар) (12). В исследование брали по одному изоляту, полученному из каждого клубенька.

Бактериальную ДНК выделяли лизированием клеток в 1 % Triton X-100 и 1 % суспензии Chelex 100 («Bio-Rad», США). Для этого небольшое количество бактериальной массы помещали в пробирки со 100 мкл 1 % Triton X-100 и 1 % суспензией Chelex 100, тщательно ресуспендировали и инкубировали при 95 °С в течение 10 мин. Суспензию центрифугировали при 12000 g в течение 3 мин. Надосадочную жидкость использовали в качестве матрицы для PCR.

Генетическое разнообразие исследуемых штаммов оценивали с помощью RAPD-анализа (random amplified polymorphic DNA) (13) со случайными праймерами LMBD 5'-gggcgctg-3', AFK1 5'-caggccatc-3' и OPA 5'-gctgcatc-3' на приборе iCycler («Bio-Rad», США) при режиме: денатурация — 95 °С, 30 с, отжиг праймера — 33 °С, 40 с, элонгация — 72 °С, 1 мин 20 с, 35 циклов.

Для PCR-RFLP-анализа (restriction fragment length polymorphism) (14) гена 16S рРНК использовали мелкощепящие эндонуклеазы рестрикции Kzo91 и HaeIII. Ген 16S рРНК был амплифицирован с помощью универсальных праймеров fD1 5'-cccggatccaagcttaaggagtgatccagcc-3', rD1 5'-ccgaa-ttcgctgacaacagagttgatcctggctcag-3', фланкирующих фрагмент гена размером около 1500 п.н. (15). Для амплификации гена *recA* использованы праймеры RecAF 5'-ggcagttcggcaagggctcag-3' и RecAR 5'-atctggtgatgaagatcacat-3' (16).

Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3500 («Applied Biosystems, Inc.», США) с использованием наборов Big Dye Terminator v.3.1 («Thermo Fisher Scientific», США) в соответствии с протоколом производителя. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакета компьютерных программ LaserGene («DNAStar, Inc.», США). Нуклеотидные последовательности для сравнительного анализа были взяты из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Филогенетический анализ исследуемых штаммов осуществляли на основании множественного выравнивания (ClustalW) секвенированных фрагментов генов 16S рРНК и *recA*. Филогенетические деревья строили методом neighbor-joining (NEIGHBOR) с помощью программы Megalign из пакета

программ LaserGene. Статистическую достоверность ветвления (bootstrap-анализ) оценивали с использованием соответствующей функции программы Megalign на основе 1000 альтернативных деревьев.

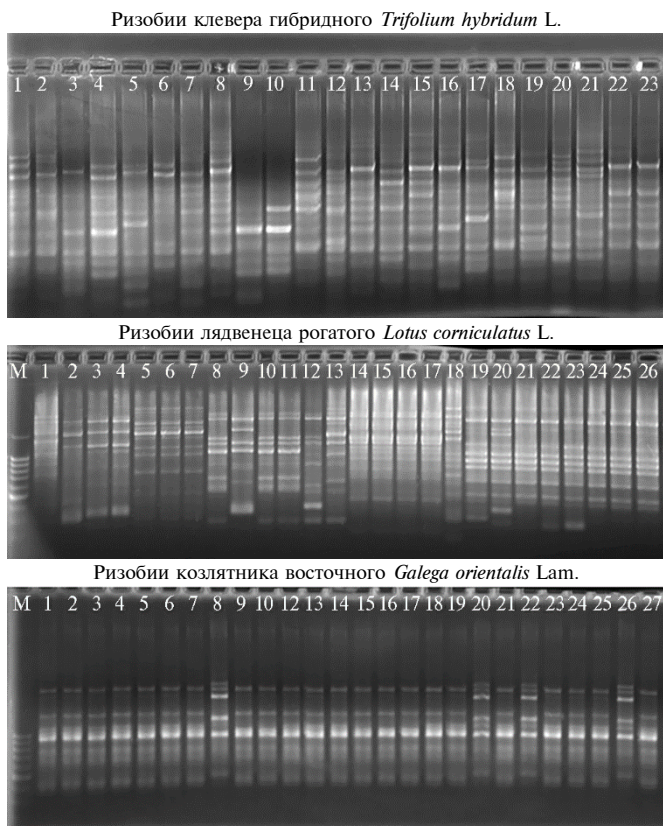
Азотфиксирующую эффективность клубеньковых бактерий оценивали по редукции ацетилена (17). Для этого получали инокулированные растения, далее от побега отделяли корни, промывали их стерильной водой и помещали в стеклянные флаконы объемом 15 мл (в одну емкость корни от одного растения). Флаконы закрывали резиновыми пробками и вводили ацетилен (10 % по объему). Флаконы с образцами и контрольными пробами (с ацетиленом и без него) помещали в темное место. Через 1 ч определяли содержание ацетилена и этилена (по времени выхода каждого газа) на газовом хроматографе с пламенным ионизационным детектором (GC-2014, «Shimadzu», Япония) по стандартному протоколу, рассчитывая количество ацетилена и этилена по калибровочной кривой. Величину азотфиксирующей активности вычисляли по формуле:  $X = C_3/3$ , где  $C_3$  — концентрация этилена в исследуемом образце, 3 — коэффициент пересчета от редукции ацетилена к азотфиксации.

Каждый штамм анализировали в трех биологических повторностях. Вычисляли средние значения ( $M$ ) и стандартные ошибки средних ( $\pm SEM$ ).

*Результаты.* В почве в естественных условиях содержится большое разнообразие штаммов ризобий, имеющих разную симбиотическую эффективность. Бобовое растение при прорастании из семени либо после пробуждения весной, если речь идет о многолетнем виде, начинает взаимодействовать с клубеньковыми бактериями, что приводит к образованию азотфиксирующих клубеньков, в которых непосредственно и происходит в дальнейшем фиксация атмосферного азота (2, 18, 19). Формирование этого взаимодействия подчинено генетически запрограммированному как со стороны растения, так и со стороны бактерии (*nod*-гены) процессу, в ходе которого бобовые и микроорганизмы обмениваются биохимическими сигналами. Последние в конечном итоге запускают процессы проникновения бактерий в корень и образования структуры клубенька (20-22). При этом растение не может оценить азотфиксирующую активность штамма, поскольку за нее отвечают *nif*-гены (в большей степени) совместно с другими генами ризобий, которые так или иначе влияют на процесс фиксации азота.

Таким образом, бобовые растения могут вступать в симбиоз с разными по эффективности штаммами, причем формирование клубеньков будет происходить в течение всего вегетационного периода, но с разной интенсивностью. Для того чтобы понять, в какой момент своего развития бобовые взаимодействуют с наиболее активно фиксирующими азот штаммами ризобий, мы собрали клубеньки с корней лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L.), клевера гибридного (*Trifolium hybridum* L.) и козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.) на разных стадиях их вегетации. Из клубеньков, собранных с корней растений, произрастающих в одной и той же точке, были выделены чистые культуры клубеньковых бактерий.

Анализ генетического полиморфизма методом RAPD показал, что бактерии, образующие клубеньки на корнях исследуемых растений, имеют разную степень полиморфности в зависимости от растения-хозяина. Наиболее гетерогенными оказались бактерии клевера гибридного, наименее — козлятника восточного (рис. 1). Эта закономерность наблюдалась как у штаммов, полученных из весенних клубеньков, так и у штаммов из клубеньков, собранных на последующих стадиях развития растений.



**Рис. 1.** Примеры электрофореграмм RAPD-профилей изолятов бактерий, полученных из клубеньков бобовых растений в начале вегетации. Цифрами обозначены номера изолятов; М — 100 п.н. маркер длин ДНК (ЗАО «Евроген», Россия).

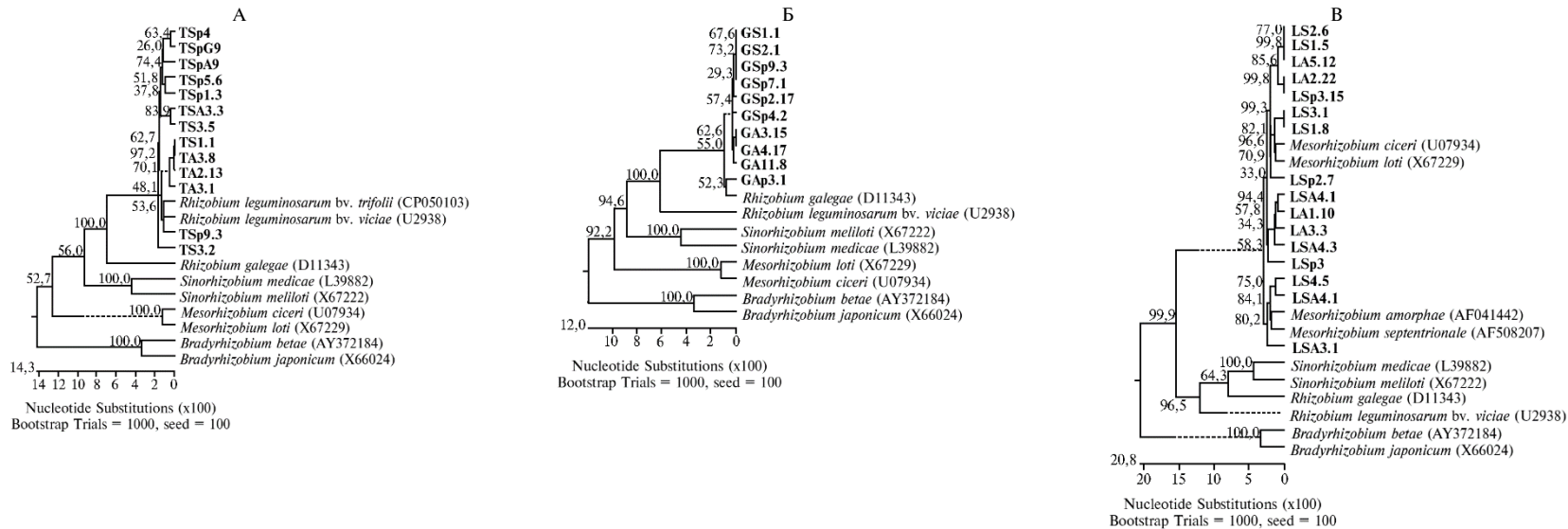
С целью определения видового состава бактерий мы провели PCR-RFLP-анализ, в ходе которого были выявлены филогенетически однородные группы микроорганизмов. Далее у представителей таких групп были секвенированы гены 16S рНК и *recA*.

Методом сравнительного анализа определенных нуклеотидных последовательностей с аналогичными последовательностями из базы данных GenBank мы выявили филогенетическое положение исследуемых штаммов микроорганизмов (рис. 2). Установлено, что все изолированные штаммы ризобий из клубеньков люцерны роговатою по последовательности как гена 16S рНК, так и гена *recA* принадлежат к роду *Mesorhizobium*, бактерии из клубеньков клевера гибридного относятся к виду *Rhizobium leguminosarum*, а микроорганизмы из клубеньков козлятника восточного — к виду *Neorhizobium galegae*.

Нуклеотидные последовательности изученных штаммов зарегистрированы в базе данных GenBank под следующими номерами:

ген 16S рНК: ON810504, ON819719, ON892022, ON834569-ON834571, OQ443231, OQ281287, OQ281289, OQ281290, OQ291567-OQ291569, OQ443237, OQ443238, OQ443243 OL872741, OL884458, OL884630, OL884456, OL884437, OM914882, OM914885, OM914886, OL884438, OL884442, OL884446;

*recA*: ON932443, ON932444, ON932446, ON932448-ON932450, OP899408, OQ102258, OQ102259, OQ102262-OQ102265, OQ111928-OQ111930, OM752310, OM811972, OM811974, OM811975, OM888662, OM888663, OM913901, OM913902, OM942752-OM942754.



**Рис. 2. Филогенетический анализ клубеньковых бактерий у изученных видов бобовых на основании сравнительного анализа последовательностей гена 16S рНК:** А — клевер гибридный (*Trifolium hybridum* L.), Б — козлятник восточный (*Galega orientalis* Lam.), В — лядвенец рогатый (*Lotus corniculatus* L.). Жирным шрифтом отмечены штаммы микроорганизмов, исследованные в настоящей работе.

Для выявления различий по эффективности штаммов клубеньковых бактерий мы сравнили их азотфиксирующую активность (табл.). В анализ взяли по 10 штаммов для каждого вида растений, которые были выделены из клубеньков, собранных в каждый из периодов развития. Установлено, что в среднем азотфиксирующая активность изолятов из клубеньков, которые были собраны в весенний период, выше по сравнению с летними изолятами (см. табл.). Такая тенденция была обнаружена при анализе ризобий у всех исследованных растений. К середине вегетационного периода азотфиксирующая активность клубеньковых бактерий снижается, а у микроорганизмов, формирующих осенние клубеньки, она варьирует в зависимости от растения-хозяина.

**Азотфиксирующая эффективность штаммов ризобий, выделенных из клубеньков, собранных на разных этапах вегетации растения-хозяина ( $N_2 \cdot \text{растение}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ , среднее из 3 повторностей,  $M \pm SEM$ )**

штамм	Весна	Лето		Осень	
	азотфиксирующая эффективность	штамм	азотфиксирующая эффективность	штамм	азотфиксирующая эффективность
Ризобии лядвенца рогатого <i>Lotus corniculatus</i> L.					
LSp1	3,17±0,61	LS1.5	10,21±0,60	LA1.10	4,01±0,34
LSp2.7	19,10±0,92	LS1.8	9,18±0,83	LA1.12	7,13±0,45
LSp3	32,70±1,71 <sup>a</sup>	LS2.1	10,49±0,82	LA2.22	6,62±0,62
LSp3.8	12,24±0,34	LS2.6	19,13±0,88	LA3.3	15,19±0,75
LSp3.10	11,53±0,81	LSA3.1	8,15±0,45	LA5.2	16,30±0,37
LSp3.15	23,97±0,98	LS3.3	8,42±0,76	LA5.7	6,64±0,85
LSp4.1	10,85±0,23	LSA4.1	9,56±0,65	LA5.12	10,12±0,77
LSp4.3	9,34±0,46	LSA4.3	8,34±0,73	LA6	5,54±0,65
LSp4.8	10,34±0,34	LS4.4	6,35±0,43	LA6.3	4,99±0,46
LSp4.11	7,85±0,45	LS4.5	7,06±0,54	LA6.4	5,54±0,53
Ризобии козлятника восточного <i>Galega orientalis</i> Lam.					
GSp1.5	15,03±0,89	GS1	23,47±0,98	GA3.11	23,21±1,34
GSp2.17	29,56±1,21	GS1.1	15,51±0,76	GA3.15	20,35±1,23
GSp3.1	24,31±1,01	GS1.6	19,13±0,56	GA4.3	21,01±1,54
GSp3.3	19,27±0,78	GS2.1	21,45±0,87	GA4.9	20,99±1,02
GSp4.2	10,09±0,65	GS2.8	17,17±0,65	GA4.17	25,39±0,98
GSp7.1	26,76±1,34	GS3	17,20±0,98	GA6.2	20,41±0,67
GSp7.4	11,42±0,76	GS3.3	19,23±1,03	GA7	22,13±1,06
GSp9.3	17,65±0,98	GS3.4	16,40±0,78	GA9.5	19,45±0,89
GSp9.7	30,75±1,34 <sup>a</sup>	GS3.7	16,67±1,13	GA11.8	18,81±0,77
GSp9.9	12,78±0,24	GS3.8	18,11±0,99	GA11.9	20,71±1,23
Ризобии клевера гибридного <i>Trifolium hybridum</i> L.					
TSpA4	25,17±0,34	TS1.1	20,53±1,08	TA1.2	25,61±1,01
TSp1.3	12,26±0,98	TS2.2	16,70±0,98	TA1.7	16,76±0,99
TSpA9	13,42±1,06	TS2.3	17,51±0,79	TA2.3	12,92±1,03
TSp2.4	32,42±1,90 <sup>a</sup>	TS3	13,73±0,56	TA2.5	19,24±0,67
TSp3.1	28,61±1,05	TS3.2	15,38±0,89	TA2.13	16,16±0,97
TSp4	27,18±1,35	TS3.3	13,20±0,67	TA3.1	14,56±0,89
TSp5.6	30,24±0,98	TS3.4	14,51±0,89	TA3.2	20,02±1,22
TSpV1	12,48±0,56	TS3.5	12,34±0,78	TA3.6	12,31±0,95
TSpG9	14,27±0,78	TS4.1	13,91±0,79	TA3.8	11,56±0,68
TSp9.3	9,91±0,52	TS4.2	11,61±0,98	TA3.9	12,46±0,78

Примечание. Буквой <sup>a</sup> отмечены наибольшие значения.

Так, азотфиксирующая эффективность бактерий лядвенца рогатого, полученных из клубеньков, собранных в весенний период, в среднем составляет  $14,11 \text{ мкг } N_2 \cdot \text{растение}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ , из летних клубеньков —  $9,59 \text{ мкг } N_2 \cdot \text{растение}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ , а из осенних —  $98,19 \text{ мкг } N_2 \cdot \text{растение}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ . Для ризобий клевера гибридного эти показатели равны соответственно  $20,61$ ;  $14,94$  и  $16,16 \text{ мкг } N_2 \cdot \text{растение}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ , для микроорганизмов козлятника восточного —  $19,76$ ;  $18,40$  и  $21,24 \text{ мкг } N_2 \cdot \text{растение}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ . При рассмотрении по отдельности изолятов, полученных из весенних, летних и осенних клубеньков, обнаруживается любопытная закономерность. Бактерии из весенних клубеньков характеризуются высоким разбросом по азотфиксирующей актив-

ности. Так, у лядвенца рогатого верхние и нижние показатели составляют в среднем соответственно 37,7 и 3,17 мкг  $N_2 \cdot \text{растение}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ , тогда как микроорганизмы из летних клубеньков демонстрируют более выравненные значения (см. табл.). То же оказалось характерно для ризобий растений других исследованных видов. А вот изоляты, выделенные из осенних клубеньков, начинают различаться 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.

Применение ризобий для повышения урожайности бобовых остается приоритетом для биологической науки. Некоторые исследователи подчеркивают, что использование местных штаммов *Rhizobium* более предпочтительно, поскольку они лучше приспособлены к изменениям окружающей среды (23). Способность аборигенных штаммов положительно взаимодействовать с резидентной микробиотой почвы и их адаптируемость к местным агроэкологическим климатическим условиям часто объясняют их превосходство над экзотическими коммерческими штаммами (24, 25). Известно, что эффективность штаммов ризобий зависит не только от вида растения, но и от его сорта, поэтому для каждого сорта в идеале необходимо подбирать свои штаммы клубеньковых бактерий (26). В этой связи проблема поиска высокоэффективных штаммов ризобий не потеряет своей актуальности в обозримом будущем.

На сегодняшний день одним из самых распространенных способов поиска высокоэффективных штаммов клубеньковых бактерий является отбор наиболее продуктивных растений с последующим выделением из их крупных клубеньков микроорганизмов. Такой подход вполне функционален, но, на наш взгляд, не лишен недостатков. Дело в том, что к тому моменту, когда растения уже можно отбирать по фенотипу, они оказываются в той стадии вегетации, когда, по полученным нами данным, у них уже прошла селекция наиболее подходящих вариантов клубеньков. При этом растение, вероятно, выбрало клубеньки с оптимальной для него азотфиксирующей активностью — не максимальной, но достаточной для нормального роста. Но для растениеводства необходимо получать сверхвысокие урожаи, чему может поспособствовать искусственная инокуляция бобовых, при которой растение можно заставить использовать высокоэффективные штаммы для формирования большей части клубеньков. Чем выше эффективность бактерий, тем выше урожайность бобовых. Как мы предполагаем, в обычных условиях растения в ходе своего развития предпочитают избавляться от единичных сверхактивных клубеньков, которые у них образовались в самом начале вегетации, поскольку такие клубеньки не выгодны самому растению, особенно если условия произрастания для него не совсем благоприятны. К таким условиям можно отнести эдафические, климатические факторы, а также факторы окружающей среды. Поэтому наиболее продуктивным, по нашему мнению, будет поиск высокоэффективных штаммов в клубеньках, образовавшихся в самом начале вегетации растения-хозяина. В этом случае есть вероятность обнаружить микроорганизмы с наибольшей азотфиксирующей активностью, которые к середине вегетационного периода уже просто будут утрачены. Кроме того, удачным, возможно, будет поиск эффективных ризобий в осенних клубеньках у многолетних растений. В этом случае растение скорее всего обеспечивает увеличение численности ризобий, чтобы они, перейдя в почву из своих структур, в новом сезоне стали кандидатами на следующее взаимодействие. При этом, поскольку



трофические связи уже не играют значимой роли, в клубеньках могут оказаться бактерии с разной эффективностью азотфиксации, и есть вероятность обнаружить среди них весьма перспективные формы.

Итак, у трех изученных нами видов бобовых — лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L.), козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.) и клевера гибридного (*Trifolium hybridum* L.) в начале вегетации клубеньки сформированы наиболее разнообразными штаммами ризобий с высоким разбросом значений азотфиксирующей активности. В этот период среди изолятов чаще всего встречаются высокоэффективные штаммы. В середине вегетации бактерии имеют относительно выравненную эффективность фиксации азота, при этом их азотфиксирующая активность ниже, чем у штаммов, выделенных в начале вегетации. В конце жизненного цикла растения состав ризобияльных изолятов достаточно разнообразен, но по эффективности фиксации азота они уступают штаммам из клубеньков молодых растений. Таким образом, мы впервые показали, что для наиболее продуктивного поиска высокоэффективных штаммов клубеньковых бактерий важен не только фенотип (значение этого параметра нами абсолютно не оспаривается), но и стадия развития растения. По нашему мнению, больше всего шансов обнаружить искомые штаммы именно в начале развития бобового растения среди первых сформировавшихся клубеньков.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Терещенко Н.И. *Биоудобрения на основе микроорганизмов*. Томск, 2003.
2. Онищук О.П., Курчак О.Н., Кимеклис А.К., Аксенова Т.С., Андронов Е.Е., Проворов Н.А. Биоразнообразие симбиозов, образуемых клубеньковыми бактериями *Rhizobium leguminosarum* с бобовыми растениями галегоидного комплекса. *Сельскохозяйственная биология*, 2023, 58(1): 87-99 (doi: 10.15389/agrobiology.2023.1.87rus).
3. Ульянич П.С., Белимов А.А., Кузнецова И.Г., Сазанова А.Л., Юзихин О.С., Лактионов Ю.В., Карлов Д.С., Вишнякова М.А., Сафронова В.И. Эффективность азотфиксирующего симбиоза гуара (*Cyatopsis tetragonoloba*) со штаммами *Bradyrhizobium retamae* RCAM05275 и *Ensifer aridi* RCAM05276 в вегетационном опыте. *Сельскохозяйственная биология*, 2022, 57(3): 555-565 (doi: 10.15389/agrobiology.2022.3.555rus).
4. Проворов Н.А., Тихонович И.А. Сельскохозяйственная микробиология и симбиогенетика: синтез классических идей и конструирование высокопродуктивных агроценозов (обзор). *Сельскохозяйственная биология*, 2022, 57(5): 821-831 (doi: 10.15389/agrobiology.2022.5.821rus).
5. Проворов Н.А., Воробьев Н.И. *Генетические основы эволюции растительно-микробного симбиоза*. СПб, 2012.
6. Ferguson V.J., Mens C., Hastwell A.H., Zhang M., Su H., Jones C.H., Chu X., Gresshoff P.M. Legume nodulation: the host controls the party. *Plant Cell Environ*, 2019, 42(1): 41-51 (doi: 10.1111/pce.13348).
7. Lindström K., Mousavi S.A. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microb. Biotechnol.*, 2020, 13(5): 1314-1335 (doi: 10.1111/1751-7915.13517).
8. Ledermann R., Schulte C.C.M., Poole P.S. How Rhizobia adapt to the nodule environment. *J. Bacteriol.*, 2021, 203(12): e0053920 (doi: 10.1128/JB.00539-20).
9. Проворов Н.А. Эволюция генетических систем симбиоза у клубеньковых бактерий. *Генетика*, 1996, 32(8): 1029-1040.
10. Franche C., Lindström K., Elmerich C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*, 2009, 321: 35-59 (doi: 10.1007/s11104-008-9833-8).
11. Sachs J.L., Ehinger M.O., Simms E.L. Origins of cheating and loss of symbiosis in wild *Bradyrhizobium*. *Journal of Evolutionary Biology*, 2010, 23(5): 1075-1089 (doi: 10.1111/j.1420-9101.2010.01980.x).
12. Баймиев А.Х., Птицын К.Г., Баймиев Ал.Х. Влияние интродукции караганы древовидной на состав ее клубеньковых бактерий. *Микробиология*, 2010, 79(1): 123-128 (doi: 10.1134/S0026261710010157).
13. Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(22): 6531-6535 (doi: 10.1093/nar/18.22.6531).

14. Laguerre G., Mavingui P., Allard M.R., Charnay M.P., Louvrier P., Mazurier S.I., Rigottier-Gois L., Amarger N. 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(6): 2029–2036 (doi: 10.1128/aem.62.6.2029-2036.1996).
15. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 1991, 173(2): 697–703 (doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991).
16. Баймиев А.Х., Иванова Е.С., Гуменко Р.С., Чубукова О.В., Баймиев Ал.Х. Анализ симбиотических генов клубеньковых бактерий бобовых растений Южного Урала. *Генетика*, 2015, 51(12): 1359–1367 (doi: 10.1134/S1022795415110034).
17. Умаров М.М. *Ассоциативная азотфиксация*. М., 1989.
18. Boivin S., Ait Lahmidi N., Sherlock D., Bonhomme M., Dijon D., Heulin-Gotty K., Le-Queré A., Pervent M., Tauzin M., Carlsson G., Jensen E., Journet E.P., Lopez-Bellido R., Seidenglanz M., Marinkovic J., Colella S., Brunel B., Young P., Lepetit M. Host-specific competitiveness to form nodules in *Rhizobium leguminosarum* symbiovar viciae. *New Phytol.*, 2020, 226(2): 555–568 (doi: 10.1111/nph.16392).
19. Sijilmassi B., Filali-Maltouf A., Boulaahyaoui H., Kricha A., Boubekri K., Udupa S., Kumar S., Amri A. Assessment of genetic diversity and symbiotic efficiency of selected Rhizobia strains nodulating lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Plants*, 2020, 10(1): 15 (doi: 10.3390/plants10010015).
20. Lalitha S., Immanuel S.P. Biochemical characterization of *Rhizobium* and its impact on black gram and green gram plants. *International Journal of Current Science*, 2013, 9: 1–6.
21. Yang J., Lan L., Jin Y., Yu N., Wang D., Wang E. Mechanisms underlying legume-rhizobium symbioses. *J. Integr. Plant Biol.*, 2022, 64(2): 244–267 (doi: 10.1111/jipb.13207).
22. Pervent M., Lambert I., Tauzin M., Karouani A., Nigg M., Jardinaud M.F., Severac D., Colella S., Martin-Magniette M.L., Lepetit M. Systemic control of nodule formation by plant nitrogen demand requires autoregulation-dependent and independent mechanisms. *J. Exp. Bot.*, 2021, 72(22): 7942–7956 (doi: 10.1093/jxb/erab374).
23. Mwangi, S.N., Karanja N.K., Boga H., Kahindi J.H.P., Muigai A., Odee D., Mwenda G.M. Genetic diversity and symbiotic efficiency of legume nodulating bacteria from different land use systems in Taita Taveta, Kenya. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 2011, 13(1): 109–118.
24. Meghvasi M.K., Prasad K., Mahna S.K. Symbiotic potential, competitiveness and compatibility of native *Bradyrhizobium japonicum* isolates to three soybean genotypes of two distinct agro-climatic regions of Rajasthan, India, Saudi. *Journal of Biological Science*, 2010, 17: 303–310 (doi: 10.1016/j.sjbs.2010.06.002).
25. Sethi D., Mohanty S., Pattanayak S.K. Acid and salt tolerance behavior of Rhizobium isolates and their effect on microbial diversity in the rhizosphere of redgram (*Cajanus cajan* L.). *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 2019, 56(3): 245–252 (doi: 10.56042/ijbb.v56i3.27652).
26. Румянцева М.Л., Владимирова М.Е., Мунтян В.С., Степанова Г.В., Саксаганская А.С., Кожемяков А.П., Орлова А.Г., Векег А., Симаров Б.В. Высокоэффективные штаммы клубеньковых бактерий люцерны (*Medicago varia* L.): молекулярно-генетическая характеристика и использование в сопряженной селекции. *Сельскохозяйственная биология*, 2019, 54(6): 1306–1323 (doi: 10.15389/agrobiology.2019.6.1306rus).

ФГБУН Институт биохимии и генетики  
Уфимского научного центра РАН,  
450054 Россия, г. Уфа, Проспект Октября, 71,  
e-mail: baymiev@anrb.ru ✉, koryakov\_igor@mail.ru,  
iv.katerina-bio@yandex.ru, vladimirovaw@bk.ru, rmat@mail.ru,  
baymiev@mail.ru

Поступила в редакцию  
9 сентября 2023 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2023, V. 58, № 5, pp. 864–874

## OPTIMIZATION OF THE SEARCH FOR HIGHLY EFFICIENT NODULE BACTERIA STRAINS FOR INOCULATION OF LEGUME PLANTS

*An.Kh. Baymiev* ✉, *I.S. Koryakov*, *E.S. Akimova*, *A.A. Vladimirova*, *R.T. Matniyazov*,  
*Al.Kh. Baymiev*

*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Center RAS*, 71, Prospekt Oktyabrya, Ufa, 450054 Russia, e-mail baymiev@anrb.ru (✉ corresponding author), koryakov\_igor@mail.ru, iv.katerina-bio@yandex.ru, vladimirovaw@bk.ru, rmat@mail.ru, baymiev@mail.ru

ORCID:

Baymiev An.Kh. [orcid.org/0000-0001-6637-9365](https://orcid.org/0000-0001-6637-9365)

Koryakov I.S. [orcid.org/0000-0001-5817-6779](https://orcid.org/0000-0001-5817-6779)

Akimova E.S. [orcid.org/0000-0002-3115-1106](https://orcid.org/0000-0002-3115-1106)

Vladimirova A.A. [orcid.org/0000-0002-0409-7861](https://orcid.org/0000-0002-0409-7861)

Matniyazov R.T. [orcid.org/0000-0002-7879-2795](https://orcid.org/0000-0002-7879-2795)

Baymiev Al.Kh. [orcid.org/0000-0003-0606-6740](https://orcid.org/0000-0003-0606-6740)

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The work was carried out using the equipment of the Center for Collective Use Biomika (Department of biochemical research methods and nanobiotechnology of the Republican Center for Collective Use Agidel) and UNU KODINK. Supported financially by the Russian Science Foundation, project RSF No. 22-24-00207

Final revision received September 09, 2023

doi: 10.15389/agrobiolgy.2023.5.864eng

Accepted September 20, 2023

## Abstract

Highly effective strains of nodule bacteria are the main component of microfertilizers used in the cultivation of leguminous plants. Using artificial inoculation with rhizobia, it is possible to achieve a significant increase in the yield of this crop. The most common way to search for highly effective strains of these microorganisms is to obtain them from the nodules of the plants themselves with subsequent selection of strains that most effectively affect plant yield. In this work, we analyzed bacteria obtained from nodules collected at different stages of development of such leguminous plants as *Trifolium hybridum* L., *Lotus corniculatus* L., and *Galega orientalis* Lam. It is shown that each plant enters into symbiosis with only one specific type of bacteria, but with a large number of its genetic variants, each of which can potentially have individual symbiotic characteristics. The greatest variety of strains was found in the nodules of *Trifolium hybridum*, and the microsymbionts of *Galega orientalis* were characterized by uniformity. It was found that at the beginning of the development of all three plant species, the nodules are formed by the most diverse strains of rhizobia which have high nitrogen-fixing activity ranging from 3.17 to 32.70  $\text{N}_2 \cdot \text{plant}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  for microsymbionts of the *L. corniculatus*, from 10.08 to 30.75  $\text{N}_2 \cdot \text{plant}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  for microsymbionts of *G. orientalis*, from 9.91 to 32.42  $\text{N}_2 \cdot \text{plant}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  for microsymbionts of *T. hybridum*. Among them, highly effective strains are found more often than in other periods. In the middle of the growing season, bacteria that form nodules on the roots of the studied leguminous plants have relatively leveled values of nitrogen fixation efficiency, from 6.35 to 19.13  $\text{N}_2 \cdot \text{plant}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  for microsymbionts of the *L. corniculatus*, from 15.51 to 23.47  $\text{N}_2 \cdot \text{plant}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  for microsymbionts *G. orientalis*, from 11.61 to 20.53  $\text{N}_2 \cdot \text{plant}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  for microsymbionts of *T. hybridum*, and their activity of nitrogen fixation are lower compared to maximum activity found in strains from nodules at the beginning of the growing season. At the end of the life cycle, nodules on the roots of the analyzed plants are formed by microorganisms that fix nitrogen with different efficiency but are still inferior in this trait to the most active «spring» strains. Thus, we believe that the search for effective strains of nodule bacteria is most productive at the initial stage of plant development.

Keywords: rhizobia, leguminous plants, *Lotus corniculatus* L., *Trifolium hybridum* L., *Galega orientalis* Lam., stage of vegetation, nitrogen fixation, highly effective strains.