

УДК 579.262

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВНЕШНИХ ФАКТОРОВ НА РЕКОМБИНАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

© 2024 г. Ан. Х. Баймиев^а, *, И. С. Коряков^а, Е. С. Акимова^а,
А. А. Владимирова^а, Ал. Х. Баймиев^а

^аИнститут биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, 450054, Россия

*e-mail: baymiev@anrb.ru

Поступила в редакцию 30.10.2023 г.

После доработки 29.01.2024 г.

Принята к публикации 29.01.2024 г.

Бобово-ризобиальный симбиоз является уникальным природным явлением, благодаря которому растение получает необходимый ему минеральный азот за счет фиксации его из атмосферы. В этом взаимодействии участвуют два партнера: бобовое растение и клубеньковые бактерии (ризобии). В дикой природе представители семейства Fabaceae вступают в симбиоз с полиморфной группой специфичных к ним ризобий, механизм и причины формирования гетерогенности которых на сегодняшний день являются предметами активного исследования. В своей работе на примере штамма бактерии *Rhizobium leguminosarum*, строго специфичного к фасоли обыкновенной, мы продемонстрировали, что в течение 30 сут при привнесении его в почву в клетках возникают генетические перестройки, проявляющиеся в изменении картины генетического профиля. Кроме того, обнаружено, что на рекомбинационную активность клеток оказывают влияние и корневые экссудаты, полученные при прорастании семян, что может свидетельствовать об участии растения в формировании полиморфизма своих микросимбионтов. Данный факт позволяет взглянуть на этот процесс не как на спонтанное, а как на контролируемое со стороны растения событие.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, симбиотические гены, филогения, симбиоз, бобовые растения

DOI: 10.31857/S0026365624040046

Клубеньковые бактерии (ризобии) — микроорганизмы, образующие азотфиксирующий симбиоз с бобовыми растениями, в результате которого на их корнях формируются специализированные структуры, называемые клубеньками, где, собственно, и происходит фиксация атмосферного азота с превращением его в аммонийную форму.

Важность бобово-ризобиального симбиоза очевидна не только для сельского хозяйства и для всего живого в целом в связи с огромным значением биологической фиксации азота, но и для изучения взаимоотношений партнеров в данном симбиотическом взаимодействии, являясь отличной моделью для этой цели. Бактерии рода *Rhizobium* являются типичными клубеньковыми бактериями, образующими клубеньки на широком круге бобовых растений. Вид *R. leguminosarum* обычно разделяют на три симбиовара по специфичности к своим растениям-хозяевам: bv. *viciae* — к растениям трибы *Vicia* (*Faba*); bv. *trifolii* — к растениям рода клевер; и bv. *phaseoli* — к фасоли (Jordan et al., 1889; Rogel et al., 2011).

У бобовых растений, особенно у дикорастущих видов, клубеньки формируются бактериями, которые фиксируют азот с разной степенью эффективности (Баймиев и соавт., 2022). К этому приводит высокий полиморфизм данных микроорганизмов. Теоретически, за многие тысячелетия совместной эволюции бобовых растений и ризобий для каждого вида растения уже должны были быть отобраны наиболее оптимальные штаммы бактерий, которые за счет размножения в клубеньках должны были сформировать основной пул микроорганизмов, с которыми растение каждый сезон вступало бы в эффективный азотфиксирующий симбиоз. На самом деле каждый год на корнях бобовых образуются клубеньки, сформированные полиморфной группой бактерий. Этому способствует необычайно высокая пластичность геномов ризобий (Martinez et al., 1990; Romero, Palacios, 1997), связанная с наличием большого количества инсерционных элементов (IS), транспозонов и повторяющихся последовательностей (Minamisawa et al., 1999; Romero et al., 1995), наибольшая концентрация

которых обнаруживается вблизи кластеров симбиотических генов (*sym*-генов). Кроме того, активное участие клубеньковых бактерий в процессе горизонтального переноса генов приводит к образованию разнообразных штаммов путем комбинации различных участков генома (Проворов, Воробьев, 2012).

Высокая вариабельность ризобий, приводящая к образованию генетического разнообразия данных микроорганизмов в ризосфере, дает возможность бобовому растению в начале вегетации “выбирать” наиболее подходящие для него варианты в зависимости от своих потребностей в азоте и возможностей обеспечивать успешную азотфиксацию в клубеньках (Проворов, Воробьев, 2012). Это позволяет макросимбионту очень гибко “настраивать” свой азотфиксирующий аппарат в зависимости от климатических и эдафических факторов.

Поскольку растение-хозяин в обмен на фиксированный азот обеспечивает своих микросимбионтов углеводным питанием, то ему приходится отдавать предпочтение бактериям с такой азотфиксирующей активностью, которая не была бы для них слишком затратной и не могла бы вместо пользы принести вред. Для того чтобы этот выбор был возможен, необходимо наличие в почве специфических для данного бобового растения штаммов ризобий, отличающихся генетическим разнообразием. Кроме того, возникновение гетерогенности в популяции клубеньковых бактерий, несомненно, играет также важную роль и в приспособлении самих микроорганизмов к изменяющимся условиям обитания. Но только до сих пор не совсем понятно, как формируются генетические варианты ризобий: возникают ли они произвольно по типу генерации случайных чисел до появления удачной комбинации, или же имеют некоторые закономерности, которые являются движущей силой, определяющей вектор изменений.

Таким образом, целью данной работы являлось исследование влияния внешних факторов на формирование разнообразия бактерий, образующих клубеньки на модельном растении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы и условия культивирования. В качестве модельного объекта была использована фасоль обыкновенная (*Phaseolus vulgaris* L.) и два специфических к этому растению штамма ризобий *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* Pvu2 и St4. Бактерии из клубеньков изолировали методом получения пункций из зоны размножения бактерий и рассевали ее на питательную агаризованную среду YM (0.1%

дрожжевой экстракт, 1% маннит, 0.05% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄, 0.01 NaCl, 1.5% агар) до отдельных колоний (Баймиев и соавт., 2010). Из каждого клубенька в работу брали по одному изоляту.

Выделение тотальной ДНК. ДНК из бактерий выделяли лизированием клеток в 1% Triton X100 и 1% суспензии Chelex100. Для этого в 1.5 мл пробирки со 100 мкл 1% Triton X100 и 1% суспензии Chelex100 помещали небольшое количество бактериальной массы и после суспензирования инкубировали при температуре 95°C 10 мин. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 12000 g в течение 3 мин. Надосадочную жидкость брали в качестве матрицы для ПЦР.

Генетический анализ штаммов. Генетическое разнообразие собранных штаммов исследовали с помощью RAPD-анализа (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams et al., 1990) с использованием следующих “случайных” праймеров: LMBD 5'-gggctg-3'; 2. AFK-1 5'-acgggtggacg-3'; 3. OPA 5'-cgctcattc-3'.

Для выявления влияния активных компонентов, выделяемых корнями при прорастании семян на рекомбинационную активность клубеньковых бактерий, семена проращивали в дистиллированной воде в стерильных условиях до начала появления зеленых проростков, после чего остаток жидкости отбирали в новую стерильную посуду. В разные стерильные пробирки на 50 мл добавляли 1 мл и 0.1 мл отобранной жидкости и приливали к ним по 1 мл культуры клеток бактерий *R. leguminosarum* с концентрацией 1×10^8 КОЕ/мл и по 8 мл свежей питательной среды YM. Бактерии культивировали в течение 1 сут при 28°C при слабом покачивании, после чего ими обработали стерильный песок. После 30 дней инкубации в песок посадили стерилизованные семена фасоли. После появления клубеньков у растений их собирали и из них получали чистые культуры ризобий.

Стерилизацию семян проводили в течение 2 мин в растворе 10% гипохлорита натрия и после трехкратной отмывки стерильной водой еще раз обрабатывали 2 мин 70% раствором этилового спирта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ризобии характеризуются высокой пластичностью генома, и для лучшего понимания закономерностей генетических процессов, происходящих у данных бактерий, по нашему мнению, необходимо их изучать именно в естественных условиях существования. Поскольку бактерии *R. leguminosarum* являются почвенными микроорганизмами (особенно те, которые способны участвовать в образовании бобово-ризобияльного симбиоза, обозначаемые как клубеньковые бактерии), то на начальных этапах работы нами было исследовано влияние

данной среды на генетическую изменчивость взятых в анализ штаммов. В первую очередь нами была проведена проверка штаммов *R. leguminosarum* Pvu2 и St4 на их способность образовывать клубеньки на корнях фасоли. Для этого ее стерильные семена инокулировали обоими анализируемыми штаммами по отдельности и выращивали на стерильном песке. После месяца прорастивания на корнях растений были обнаружены клубеньки, из которых в дальнейшем были выделены бактерии. Анализ на генетическую идентичность выявил абсолютное сходство изолятов микроорганизмов, полученных из клубеньков, с исходными штаммами, которыми осуществляли предпосевную инокуляцию. Это говорит о том, что изменения генома бактерий внутри клубенька за счет внутренней рекомбинации не произошло.

На следующем этапе нами была выбрана почва, на которой фасоль обыкновенная не формирует клубеньки ввиду отсутствия в ней специфичных для данного растения штаммов ризобий. Хотя другие бобовые, такие как представители рода клевер (*Trifolium*) и горошек (*Vicia*), которые также вступают в симбиоз с бактериями вида *R. leguminosarum*, клубеньки здесь успешно образуют. В дальнейшем данная почва была инокулирована выбранными для исследования штаммами (Pvu2 и St4), являющимися специфичными к фасоли обыкновенной. Причем инокуляцию проводили одновременно обоими штаммами для того, чтобы оценить их конкурентоспособность. Через 30 дней инкубации в анализируемую почву посадили стерильные семена фасоли. После месяца выращивания из образованных клубеньков были выделены изоляты бактерий, которые в дальнейшем исследовали методом фингерпринт-анализа с целью сопоставления профилей их геномов с таковыми у исходных штаммов. Ввиду высокой специфичности клубеньки могут быть сформированы только за счет привнесенных в почву микроорганизмов. Таким образом, появляется возможность из общего микробиома почвы обратно вычленить искусственно добавленные бактерии, которые какое-то время находились в почве.

При анализе изолятов, выделенных из клубеньков фасоли, было выявлено, что все клубеньки образованы только дериватами одного из привнесенных штаммов — Pvu2, что говорит о большей конкурентоспособности данного штамма по сравнению с St4. Кроме того, было обнаружено, что многие изоляты приобрели отличия в своих генетических профилях по сравнению с исходным вариантом. В RAPD профилях анализируемых микроорганизмов, по сравнению с исходным штаммом, можно наблюдать появление и исчезновение полос, что свидетельствует о произошедших рекомбинационных событиях в геномах данных бактерий (рис. 1, А).

В то время как у изолятов, полученных из клубеньков фасоли, обработанные этими же штаммами семена которой были высажены в стерильный песок, в RAPD профилях изменений практически не выявляется. Это, с одной стороны, показывает изначальную однородность бактерий, с другой — отсутствие внутренней рекомбинации микроорганизмов после заражения растения, что исключает влияние растения на изменение их генетического профиля при эндофитном состоянии (рис. 1, Б).

В статье приведены фореграммы RAPD анализов с использованием праймера AFK-1. Именно этот праймер оказался наиболее информативным и лучше всего показал полиморфизм образцов. С применением остальных олигонуклеотидов образовывалось меньше полос, и результаты оказались менее наглядными. Но тем не менее, использование нескольких праймеров в RAPD анализе дало возможность более уверенно утверждать в некоторых случаях об отсутствии изменений в структуре генома.

Бобовое растение для своего успешного роста и развития нуждается в эффективном симбиозе с клубеньковыми бактериями, где важную роль играет наличие в его ризосфере подходящих штаммов, специфичных для него ризобий. Формирование их разнообразия для макросимбионта имеет жизненно важное значение. С целью исследования участия растения в регуляции процессов рекомбинации у клубеньковых бактерий нами было

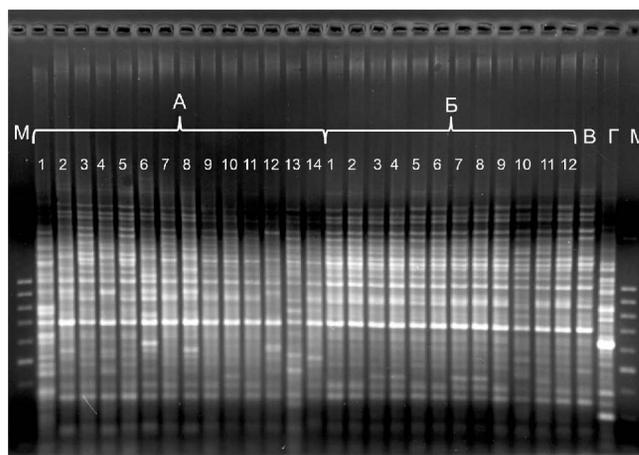


Рис. 1. Фореграмма RAPD-профилей изолятов ризобий, полученных из клубеньков фасоли обыкновенной, с использованием праймера AFK-1: А — профили изолятов, выделенных из клубеньков растения, выращенного на почве, инокулированной штаммами *R. leguminosarum* Pvu2 и St4 после 30-дневной инкубации; Б — профили изолятов, полученных из клубеньков растения, выращенного на стерильном песке сразу после инокуляции штаммами *R. leguminosarum* Pvu2 и St4; В — профиль штамма Pvu2; Г — профиль штамма St4; М — 100 п.н. маркер.

проанализировано влияние экссудатов, выделяемых корнями при прорастании семян, на изменение генетического профиля исследуемых штаммов микроорганизмов. Для этого были взяты корневые выделения проростков фасоли обыкновенной, которыми были обработаны ризобии штамма Pvu2. Затем этими бактериями инокулировали стерильный песок. После 30 дней инкубации данных микроорганизмов в песке в него были посажены стерилизованные семена фасоли. При анализе изолятов, полученных из образовавшихся на корнях растения клубеньков, было обнаружено, что корневые выделения прорастающих семян оказывают влияние на генетические перестановки у исследуемого штамма бактерий (рис. 2). Таким образом, можно предположить, что растение способно активно участвовать в образовании генетического разнообразия у потенциальных микросимбионтов.

В естественных условиях дикорастущие бобовые растения редко растут в монокультурах, и в сообществе с одними бобовыми часто произрастают и другие представители этого семейства. Рядом могут оказаться растения, вступающие в симбиоз с одними и теми же видами ризобий, но имеющими разную специфичность по отношению к макросимбионту. В этой связи мы провели опыт по исследованию влияния одного растения на изменение генетического профиля микросимбионтов другого. Для этого в инокулированную штаммами Pvu2 и St4 почву после 30 дней инкубации вначале были высажены семена гороха посевного, который образует клубеньки с аборигенными бактериями *R. leguminosarum*, присутствующими во взятой в работу почве, но который при этом не вступает в симбиоз со 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, достигалось наибольшее соприкосновение ризосферы гороха посевного и вновь посаженной фасоли обыкновенной. Параллельно на ту же инокулированную почву были посажены семена фасоли, но без предварительного проращивания в ней гороха. Через месяц с ее корней были собраны клубеньки и выделены чистые культуры ризобий. С полученными изолятами также был проведен фингерпринт-анализ, в ходе которого были получены интересные данные. Обнаружено, что растения фасоли, посаженные на корневище гороха, образовали клубеньки с группой бактерий, которые имели меньше отличий в картине своих генетических профилей по сравнению с исходным штаммом, чем микроорганизмы, полученные из клубеньков растений, выращенных на почве без предварительного проращивания в ней гороха (рис. 3).

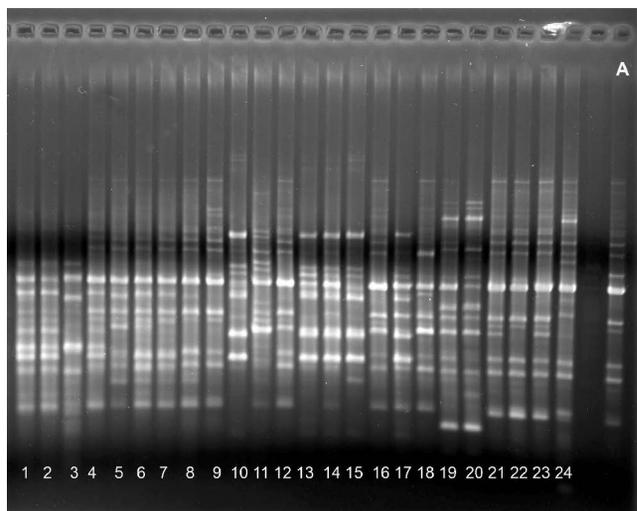


Рис. 2. Фореграмма RAPD-профилей изолятов ризобий, полученных из клубеньков фасоли обыкновенной, инокулированной бактериями после 30-дневной инкубации с корневыми выделениями проростков с использованием праймера AFK-1. А – профиль исходного штамма Pvu2.

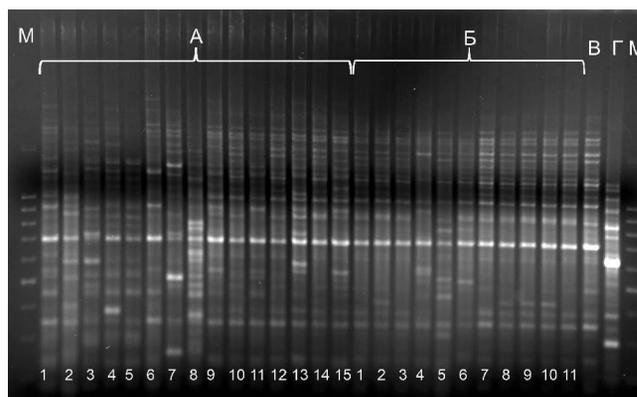


Рис. 3. Фореграмма RAPD-профилей изолятов ризобий, выделенных из клубеньков фасоли обыкновенной с использованием праймера AFK-1. А – профили изолятов, полученных из клубеньков растения, выращенного на почве, инокулированной штаммом *R. leguminosarum* Pvu2 после 30-дневной инкубации; Б – профили изолятов, полученных из клубеньков растения, выращенного в корневой системе гороха посевного на почве, инокулированной штаммом *R. leguminosarum* Pvu2; В – профиль штамма Pvu2; Г – профиль штамма St4; М – 100 п.н. маркер.

Высокая пластичность геномов ризобий, о которой известно давно, является основной причиной большого разнообразия штаммов данных бактерий. Благодаря этому в начале каждого цикла своего развития растения имеют возможность выбирать среди такого разнообразия наиболее

оптимальные варианты в зависимости от условий произрастания (Fischer, 1994; Проворов, Воробьев, 2000; Nandasena et al., 2006; Andam et al., 2007; Barcellos et al., 2007; Zhao et al., 2008). В своей работе по анализу возникновения перестроек в геномах у двух штаммов клубеньковых бактерий в условиях почвенной среды мы обнаружили, что у исследуемых микроорганизмов довольно быстро, а именно уже через 30 дней инкубации, происходят различные генетические перестройки, проявляющиеся в виде изменения генетического профиля. Мы на данном этапе работы пока не можем утверждать, происходит ли это за счет внутренних рекомбинационных процессов или связано с горизонтальным переносом генов. Но, очевидно, что почвенная среда и, скорее всего, ее микробиом благоприятно влияют на эти процессы. И можно сказать, что уже через относительно непродолжительное время привнесенные штаммы “растворяются” в общем микробиоме, образуя большое количество других генетических вариантов этого вида. Новые штаммы ризобий при привнесении их в почву, вероятно, недолго сохраняются в неизменном виде, но при этом каждый из них может быть источником новых генов или их сочетаний для общего пангенома микробного сообщества этой среды.

Для успешного роста бобовым растениям жизненно важно взаимодействовать со специфичными для них клубеньковыми бактериями, формирование разнообразия которых для них крайне необходимо. В литературе уже появляются работы, свидетельствующие о влиянии растений на генетические процессы бактерий в своей ризосфере (Ling et al., 2016). Полученные нами данные о способности макросимбионта через корневую экссудацию оказывать воздействие, а, возможно, и контролировать процессы генетических перестроек у микросимбионтов подтверждает, что бобовые являются непосредственными участниками формирования разнообразия штаммов ризобий в своей ризосфере, что заставляет под другим углом взглянуть на эти процессы.

Обнаруженный нами интересный факт о том, что растения фасоли, посаженные на корневище гороха, образовали клубеньки с группой бактерий, которые имели меньше различий в картине своих генетических профилей по сравнению с исходным штаммом, в отличие от микроорганизмов, полученных из клубеньков растений, выращенных на почве без предварительного проращивания в ней гороха, говорит об очень непростых отношениях бобовых и бактерий. В данном случае мы можем предположить, что растения способны активировать отдельно взятые штаммы, которые в дальнейшем будут формировать большую часть клубеньков. А также возможно, что одни растения способны через корневые выделения оказывать влияние на рекомбинационные

процессы определенной группы ризобий других растений. Но все это требует дальнейшего, более детального исследования.

В данной работе мы использовали специфичность образования симбиоза между фасолью и взятыми в работу штаммами как инструмент, позволяющий направленно отбирать среди множества разнообразных бактерий, образующих микробиом почвы, только те из них, которые имеют фенотип, узнаваемый этим растением-хозяином. И поскольку данным фенотипом обладали только привнесенные нами штаммы микроорганизмов, то клубеньки могли образовывать лишь только они, их дериваты, или же получившие этот фенотип посредством горизонтального переноса генов бактерии. Тридцать дней инкубации, вероятно, небольшой срок, и мы в своих опытах в клубеньках встречаем в основном производные только одного штамма, но тем не менее, уже получившие некоторые изменения в своем генетическом профиле. Но тут нельзя забывать и о том, что мы не можем судить о степени изменений в генотипах бактерий в целом, поскольку не имеем возможности отследить все микроорганизмы, а лишь только те, которые смогли образовать клубеньки на корнях растений. Здесь особое значение приобретает элемент конкурентоспособности, поскольку даже при внесении нами двух разных штаммов ризобий, способных по отдельности активно образовывать клубеньки, по факту их формируют только производные одного из них. Любое изменение в генотипе бактерий может сказаться на их клубенкообразующей активности, и те варианты микроорганизмов, которых коснулись изменения областей генома, связанных с механизмами взаимодействия с растением, могут выпасть из поля зрения. Но тем не менее, по тем результатам, которые нами были получены, уже можно с уверенностью судить о том, что новые штаммы *R. leguminosarum* формируются с высокой интенсивностью, и они не являются статичными единицами, а представляют собой находящиеся в постоянной генетической динамике организмы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с привлечением приборного парка ЦКП “Биомика” (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП “Агидель”) и УНУ “КОДИНК”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данное исследование было выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-24-00207 (<https://rscf.ru/project/22-24-00207/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баймиев А.Х., Акимова Е.С., Коряков И.С., Владимирова А.А., Баймиев А.Х. Зависимость состава клубеньковых бактерий лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus*) от стадии вегетации растения-хозяина // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 586–596.
- Baymiev An. Kh., Akimova E.S., Koryakov I.S., Vladimirova A.A., Baymiev Al. Kh. The composition of *Lotus corniculatus* root nodule bacteria depending on the host plant vegetation stage // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 553–562.
- Баймиев А.Х., Птицын К.Г., Баймиев А.Х. Влияние интродукции караганы древовидной на состав ее клубеньковых бактерий // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 123–128.
- Baymiev An.K., Pritsyn K.G., Baimiev Al.K. Influence of the introduction of *Caragana arborescens* on the composition of its root nodule bacteria // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 115–120.
- Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Эволюционная генетика клубеньковых бактерий: молекулярные и популяционные аспекты // Генетика. 2000. Т. 36. С. 1573–1587.
- Provorov N.A., Vorob'ev N.I. Evolutionary genetics of nodule bacteria: molecular and population aspects // Russ. J. Genet. 2000. V. 36. P. 1323–1335.
- Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Генетические основы эволюции растительно-микробного симбиоза. СПб.: Информ-Навигатор, 2012. 400 с.
- Andam C.P., Mondo S.J., Parker M.A. Monophyly of *nodA* and *nifH* genes across Texan and Costa Rican populations of *Cupriavidus* nodule symbionts // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 4684–4690.
- Barcellos F.G., Menna P., Batista J.S., Hungria M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah Soil // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 2635–2643.
- Fischer H.M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia // Microbiol. Rev. 1994. V. 58. P. 352–386.
- Jordan D.C. Genus I. *Rhizobium* Frank // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Eds. Krieg N.R., Holt J.G. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. V. 1. P. 235–242.
- Ling J., Wang H., Wu P., Li T., Tang Y., Naseer N., Zheng H., Masson-Boivin C., Zhong Z., Zhu J. Plant nodulation inducers enhance horizontal gene transfer of *Azorhizobium caulinodans* symbiosis island // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. P.13875–13880.
- Martinez E., Romero D., Palacios R. The *Rhizobium* genome // Crit. Rev Plant Sci. 1990. V. 9. P. 59–93.
- Minamisawa K., Nakatsuka Y., Isawa T. Diversity and field site variation of indigenous populations of soybean bradyrhizobia in Japan by fingerprints with repeated sequences RS α and RS β // FEMS Microbiol. Ecol. 1999. V. 29. P. 171–178.
- Nandasena K.G., O'Hara G.W., Tiwari R.P., Howieson J.G. Rapid in situ evolution of nodulating strains for *Biserrula pelecinus* L. through lateral transfer of a symbiosis island from the original mesorhizobial inoculant // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 7365–7367.
- Rogel M.A., Ormeño-Orrillo E., Romero E.M. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes // Syst. Appl. Microbiol. 2011. V. 34. P. 96–104.
- Romero D., Martinez-Salazar J., Girard L., Brom S., Dávila G., Palacios R., Flores M., Rodríguez C. Discrete amplifiable regions (amplicons) in the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 // J. Bacteriol. 1995. V. 177. P. 973–980.
- Romero D., Palacios R. Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes // Annu. Rev. Genet. 1997. V. 31. P. 91–111.
- 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 // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 6531–6535.
- 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 *Astragalus* species grown in the temperate regions of China // FEMS Microbiol. Lett. 2008. V. 286. P. 263–273.

EXPERIMENTAL ARTICLES

**Effect of Environmental Factors on Recombinant Activity
of Root Nodule Bacteria**

**An. Kh. Baymiev¹,*, I. S. Koryakov¹, E. S. Akimova¹,
A. A. Vladimirova¹, and Al. Kh. Baymiev¹**

¹*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*
**e-mail: baymiev@anrb.ru*

Received October 30, 2023; revised January 29, 2024; accepted January 29, 2024

Abstract. The legume-rhizobia symbiosis is a unique natural phenomenon, which supplies the plant with the necessary mineral nitrogen via fixation of atmospheric dinitrogen. This interaction involves two partners: the legume plant and root nodule bacteria (rhizobia). In the wild, members of the *Fabaceae* family enter into symbiosis with a polymorphic group of rhizobia specific to them; the mechanism and reasons for the formation of heterogeneity of rhizobia are currently the subject of active research. In the present work, a *Rhizobium leguminosarum* strain strictly specific to *Phaseolus vulgaris* L. was used to show that within 30 days upon its introduction into soil, genetic rearrangements occurred in the cells, as was revealed by changes in the pattern of its genetic profile. It was also found that recombination activity of the cells was also affected by the root exudates produced during seed germination, which may indicate involvement of the plant in the formation of polymorphism of its microsymbionts. These findings suggest interpretation of this process not as a spontaneous event, but rather as the event controlled by the plant.

Keywords: root nodule bacteria, symbiotic genes, phylogeny, symbiosis, legumes