The strategy for choosing nodule bacteria by perennial leguminous plants, depending on the stage of their vegetation

Akimova E.S., Koryakov I. S., Baymiev An.Kh.

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia.

E-mail: iv.katerina-bio@yandex.ru

Key message. Data on the genetic diversity and phylogeny of nodule bacteria of the wild perennial legume *Lotus zhegulensis* at different stages of its vegetation are obtained.**Keywords:** highly effective symbiosis, perennial legumes, vegetative stage, nodule bacteria, genetic diversity of nodule bacteria

Leguminous plants of a temperate climate, mostly perennial, during their ontogenesis go through multiple cycles of interaction with nodule bacteria (rhizobia). Gaining knowledge about the level of specificity when choosing symbiotic partners by plants at different stages of their vegetation is an important condition for creating highly effective symbioses for plant growing.

The goal is to analyze the genetic composition of rhizobia obtained from nodules of wild perennial leguminous plants at different stages of their vegetation. The following methods were used: polymerase chain reaction (PCR) and its modifications (RAPD, RFLP), sequencing and analysis of nucleotide sequences.

At this stage of the work, the genetic composition of rhizobia obtained from nodules *Lotus zhegulensis* was analyzed. Nodules were collected at different stages of its growing season: in summer – at the stage of seed ripening and in autumn - at the end of the growing season, of which 75 and 55 isolates were subsequently isolated, respectively. Subsequent analysis of genetic diversity by the RAPD method using several arbitrary primers showed that all isolates are characterized by a relatively low polymorphism of the DNA sequence, while the RFLP profile of the 16S rRNA gene microorganisms isolated from autumn nodules are more heterogeneous than those obtained from summer "nodules. Determination of the phylogenetic position of the strains showed that according to the 16SrRNA and *recA* gene sequences, all the bacteria analyzed were related to microorganisms of the genus *Mesorhizobium*. In addition, the phylogeny of their symbiotic genes (sym genes) was studied: *nifH* and *nifD*, the presence of which in the bacterial genome is a prerequisite for the formation of an effective nitrogen-fixing symbiosis. Phylogenetic analysis of *nifH* and *nifD* revealed that studied microorganisms according to the sequences of these genes belong to bacteria of the genus *Mesorhizobium* as well. In the future, it is planned to isolate bacteria from nodules, which will be collected from the roots of *Lotus zhegulensis* at an early conduct their genetic analysis. Also, microsymbionts and other perennial wild bean plants obtained at various stages of their ontogenesis will be investigated.

This work was financially supported by the RFBR №17-44-020201.

Стратегия выбора клубеньковых бактерий многолетними бобовыми растениями в зависимости от стадии их вегетации

Акимова Е.С., Коряков И.С., Баймиев Ан.Х.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

Аннотация. Получены данные о генетическом разнообразии и филогении клубеньковых бактерий дикорастущего многолетнего бобового растения *Lotus zhegulensis* на разных стадиях его вегетации.**Ключевые слова:** эффективный симбиоз, многолетние бобовые растения, стадии вегетации, клубеньковые бактерии, генетическое разнообразие ризобий

Бобовые растения умеренного климата, в большей степени многолетние, в ходе своего онтогенеза проходят многократные циклы взаимодействия с клубеньковыми бактериями (ризобиями). Получение знаний об уровне специфичности при выборе симбиотических партнеров растениями на разных стадиях их вегетации является важным условием для создания высокоэффективных симбиозов для растениеводства.

Целью данного исследования стал анализ генетического состава ризобий, полученных из клубеньков дикорастущих многолетних бобовых растений на разных стадиях их вегетации. Были использованы следующие методы: полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ее модификации (RAPD, ПДРФ), секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей.

На данном этапе работы был проведен анализ генетического состава ризобий, полученных из клубеньков лядвенца жигулевского (*Lotus zhegulensis*). Клубеньки были собраны на разных стадиях его вегетации: летом – на этапе созревания семян и осенью – в конце вегетации, из которых в дальнейшем было выделено 75 и 55 изолятов соответственно. Последующий анализ генетического разнообразия методом RAPD с использованием нескольких произвольных праймеров показал, что все изоляты отличаются относительно низким полиморфизмом последовательности ДНК, в то время как по ПДРФ-профилю гена 16S рРНК микроорганизмы, выделенные из «осенних» клубеньков более разнородны, чем таковые, полученные из «летних» клубеньков. Определение филогенетического положения штаммов показало, что по последовательностям генов 16SpРНК и *recA*, все анализируемые бактерии, являются родственными с микроорганизмами рода *Mesorhizobium*. Кроме того, была изучена филогения их симбиотических генов (*sym*-генов): *nifH* и *nifD*, наличие которых в геноме бактерий является обязательным условием для формирования эффективного азотфиксирующего симбиоза. Филогенетический анализ *nifH* и *nifD* выявил принадлежность исследуемых микроорганизмов по последовательностям данных генов также к бактериям рода *Mesorhizobium*. В дальнейшем планируется выделить бактерии из клубеньков, которые будут собраны с корней лядвенца жигулевского на ранней стадии его вегетации (весной), и также провести их генетический анализ. Также будут исследованы микросимбионты и других многолетних дикорастущих бобовых растений, полученные в различные стадии их онтогенеза. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ p_а №17-44-020201.