

Д. В. Крутило

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва
НААН, вул. Шевченка, 97, Чернігів, 14027, Україна,
тел.: +38(04622) 3 17 49, e-mail: krutylodv@gmail.com

RFLP-АНАЛІЗ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ ВИДУ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*, ПОШИРЕНИХ В АГРОЦЕНОЗАХ УКРАЇНИ

Мета. Дослідити генетичну різноманітність бульбочкових бактерій – мікросимбіонтів сої, поширених в агроценозах України. **Методи.** Бульбочкові бактерії виділяли з бульбочок сої, яку вирощували на зразках ґрунту, відібраних у різних регіонах України. Ампліфікацію міжгенного регіону 16S-23S рРНК (ITS-регіон) проводили з використанням праймерів FGPS1490-72 та FGPL132-38. Для рестрикції ПЛР-продуктів застосовували ендонуклеази рестрикції *MspI*, *HaeIII* та *NdeII*. **Результати.** За використання методу ПЛР-RFLP досліджено різноманітність штамів *Bradyrhizobium japonicum* з різною швидкістю росту. Аналіз 16S-23S рДНК за використання рестриктаз *MspI*, *HaeIII* та *NdeII* показав, що усі інтенсивнорослі штами мали однакові рестрикційні профілі, на основі чого вони об'єднані в одну генетичну групу. За рестрикції ITS-регіону повільнорослих штамів ферментом *MspI* їх віднесено до двох генетичних груп, *HaeIII* – до трьох, *NdeII* – до чотирьох геномогруп. **Висновки.** Виявлена висока гетерогенність штамів *B. japonicum*, вилучених із агроценозів сої. За структурою міжгенного регіону їх віднесено до різних ITS-типів. Повільнорослі штами виявилися більш різноманітними порівняно із штамами з інтенсивним ростом, які утворювали гомогенну геномогрупу.

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, генетичний поліморфізм, ITS-регіон, RFLP-аналіз, соя.

Інтенсивне впровадження бобових культур на нових територіях сприяє збільшенню біологічної різноманітності їх мікросимбіонтів – бульбочкових бактерій (ризобій). Інформація щодо генетичних властивостей місцевих ризобій може бути корисною при вивченні популяційної генетики та екології цих мікроорганізмів [13].

Молекулярно-біологічні методи, що використовуються для оцінки різноманітності бульбочкових бактерій, включають аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (RFLP), аналіз поліморфізму довжини ампліфікованих фрагментів (AFLP), аналіз довільно ампліфікованої поліморфної ДНК (RAPD). Інші методи, такі як гібридизація ДНК-ДНК та аналіз мультилокусного секвенування (MLSA) також актуальні при вивченні ризобіальної таксономії та різноманіття [8, 13].

© Д. В. Крутило, 2017



Як філогенетичні маркери застосовують гени «домашнього господарства» (housekeeping genes), а також гени рибосомального кластеру. Проте слід наголосити, що рибосомні гени є консервативними і використовуються в основному для диференціації мікроорганізмів на родовому рівні. Більш варіабельними, ніж структурні рибосомні гени, є міжгенні спейсерні ділянки (спейсер – це нуклеотидна послідовність ДНК, яка розділяє гени). Використання їх для ідентифікації дозволяє розрізнити близько споріднені види і підвиди мікроорганізмів.

За використання сучасних молекулярно-генетичних методів встановлено, що у симбіотичні взаємовідносини з культурною соєю (*Glycine max* (L.) Merr.) можуть вступати бульбочкові бактерії різних родів: *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*) та *Mesorhizobium*. Вони представлені кількома видами бактерій з різною швидкістю росту: повільнорослі *Bradyrhizobium japonicum* [5], *B. elkanii* [7], *B. liaoningense* [15] і *B. yuanmingense* [16] та швидкорослі *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *fredii*, *S. xinjiangensis* [10] і *M. tianshanense* [4]. Типовими мікросимбіонтами сої в ґрунтах України виступають лише повільнорослі бульбочкові бактерії виду *B. japonicum* [1].

При проведенні моніторингу місцевих ризобій сої нами встановлено, що в агроценозах України сформувалися і функціонують різні за щільністю локальні популяції цих мікроорганізмів. Незважаючи на одноманітність інтродукованих штамів-інокулянтів, ґрунтові популяції є досить гетерогенними. Серед їх представників виявлено штами, які характеризуються підвищеною швидкістю росту і умовно названі «штамами з інтенсивним ростом». Ці штами мають комплекс характерних ознак і істотно відрізняються від типових повільнорослих ризобій сої за морфолого-культуральними, фізіологічними, хемотаксономічними та серологічними властивостями [2, 6]. Проведення молекулярно-генетичного аналізу бульбочкових бактерій сої з різною швидкістю росту дозволить краще зрозуміти особливості формування популяцій мікросимбіонтів цієї культури в ґрунтах України та їх здатність адаптуватися до конкретних екологічних умов.

Метою нашої роботи було дослідити генетичну різноманітність бульбочкових бактерій – мікросимбіонтів сої, поширених в агроценозах України.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були штами *B. japonicum*, виділені з бульбочок сої, яку вирощували на зразках ґрунту з різних регіонів України: Вінницької, Сумської, Київської та Чернігівської областей. Також використовували типовий штам *Bradyrhizobium japonicum* VKM B-1967 (USDA 6^T), штам *B. japonicum* 6346 та штам-реізолят *B. japonicum* OR – біоагент препарату Оптимайз.

Для типування штамів ризобій сої та виявлення їх ідентичності проводили RFLP-аналіз (*restriction fragments length polymorphism*) послідовностей між генами 16S рРНК та 23S рРНК (ITS-регіон).

ДНК виділяли з 5-ти добових культур за допомогою набору «ДНК-со-рб Б» (метод швидкого лізису). Ампліфікацію міжгенного спейсера 16S-23S рРНК здійснювали за допомогою праймерів: FGPS1490-72 та FGPL132-38 [9,



11]. Температурно-часовий профіль ампліфікації: денатурація при 94 °С – 30 с, відпал праймерів при 55 °С – 30 с, синтез комплементарного ланцюга при 72 °С – 1 хв (30 циклів).

Рестрикцію ПЛР-продуктів проводили за використання ендонуклеаз рестрикції *MspI*, *HaeIII*, *NdeII* ("Fermentas", США) згідно з інструкцією виробника. Оброблену рестриктазами ДНК аналізували за допомогою електрофорезу у 2,5% агарозному гелі. Розмір отриманих фрагментів ДНК визначали із застосуванням комп'ютерної програми Total Lab v. 2.01.

Результати та їх обговорення

У роботі досліджували одинадцять штамів *B. japonicum* з повільним та інтенсивним ростом (табл. 1). Усі інтенсивнорослі штами, вилучені з ґрунтів різних регіонів України, відносяться до однієї серогрупи – KB11. Повільнорослі ризобії належать до п'яти серологічних груп: 1967, 46, M8, 6346 та OR.

Таблиця 1

Характеристика штамів *B. japonicum* з різною швидкістю росту

Table 1

Characteristic of *B. japonicum* strains with different growth rates

Штами мікроорганізмів	Місце виділення	Характер росту на агаризованому середовищі	Серогрупа
<i>B. japonicum</i> KB1	Україна, Вінницька обл.	Інтенсивний	KB11
<i>B. japonicum</i> KC20	Україна, Сумська обл.	Інтенсивний	KB11
<i>B. japonicum</i> KC21	Україна, Сумська обл.	Інтенсивний	KB11
<i>B. japonicum</i> 1967 (USDA 6T)	Японія	Повільний	1967
<i>B. japonicum</i> 46	Україна, Вінницька обл.	Повільний	46
<i>B. japonicum</i> KC2	Україна, Сумська обл.	Повільний	M8
<i>B. japonicum</i> CH2	Україна, Чернігівська обл.	Повільний	46
<i>B. japonicum</i> 6346	Росія	Повільний	6346
<i>B. japonicum</i> OR	Україна, Вінницька обл.	Повільний	OR
<i>B. japonicum</i> SK4	Україна, Київська обл.	Інтенсивний	KB11
<i>B. japonicum</i> K32	Україна, Київська обл.	Інтенсивний	KB11



Для диференціації зазначених штамів на внутрішньовидовому рівні нами досліджено поліморфізм їх міжгенного спейсера 16S-23S рРНК (ITS-регіон). Як видно з рис. 1, за ампліфікації ITS-регіону в усіх штамів утворювався один фрагмент ДНК розміром ~1000 пар нуклеотидів (п.н.), який потім порізно розщеплювали трьома ферментами ендонуклеазами рестрикції: *MspI*, *HaeIII* та *NdeII*.

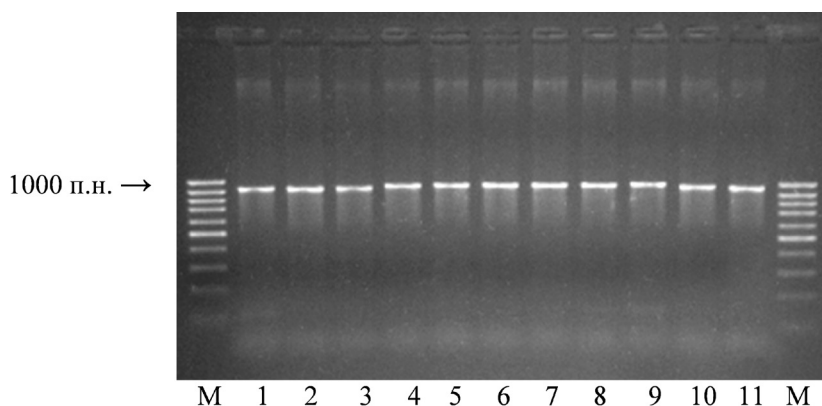


Рис. 1. Результати ПЛР-ампліфікації 16S-23S рДНК штамів *B. japonicum* з різною швидкістю росту:

М – маркер молекулярної маси; штамів *B. japonicum* з інтенсивним ростом:
1 – KB1, 2 – KC20, 3 – KC21, 10 – СК4, 11 – К32;
штамів *B. japonicum* з повільним ростом:
4 – типовий штам VKM В-1967 (USDA 6^Т),
5 – 46, 6 – KC2, 7 – CH2, 8 – 6346, 9 – OR.

Fig. 1. Results of PCR amplification of 16S-23S rDNA from *B. japonicum* strains with different growth rate:

М – marker of molecular weight M100; strains of *B. japonicum* with an intensive growth rate
(1 – KB1, 2 – KC20, 3 – KC21, 10 – СК4, 11 – К32);
strains of *B. japonicum* with slow growth rate
(4 – type strain *B. japonicum* VKM В-1967 (USDA 6^Т),
5 – 46, 6 – KC2, 7 – CH2, 8 – 6346, 9 – OR).

Використання ПЛР із наступним рестрикційним аналізом дозволило виявити варіабельність ITS-регіону у штамів *B. japonicum* різного еколого-географічного походження (рис. 2). Внаслідок незалежного розщеплення ампліфікатів міжгенного спейсера трьома рестриктазами утворювалося від 3 до 5 фрагментів ДНК. Порівняння отриманих патернів свідчить, що за використання кожної з рестриктаз формувався свій характерний набір фрагментів ДНК.

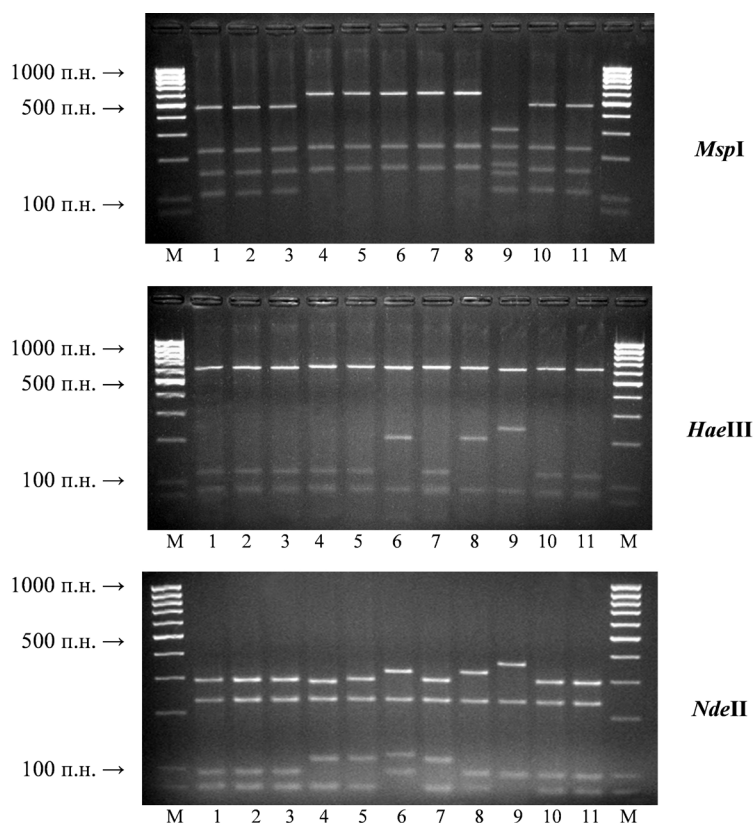


Рис. 2. Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції 16S-23S рДНК штамів *B. japonicum* після обробки рестриктазами:

М – маркер молекулярної маси М100; штами *B. japonicum* з інтенсивним ростом (1 – KB1, 2 – KC20, 3 – KC21, 10 – СК4, 11 – K32); штами *B. japonicum* з повільним ростом (4 – типовий штам *B. japonicum* VKM B-1967 (USDA 6^Т), 5 – 46, 6 – KC2, 7 – CH2, 8 – 634б, 9 – OR).

Fig. 2. Electrophoretic analysis of restriction products 16S-23S rDNA of *B. japonicum* strains after processing by restrictases:

М – marker of molecular weight M100; strains of *B. japonicum* with intensive growth rate (1 – KB1, 2 – KC20, 3 – KC21, 10 – СК4, 11 – K32); strains of *B. japonicum* with slow growth rate (4 – type strain *B. japonicum* VKM B-1967 (USDA 6^T), 5 – 46, 6 – KC2, 7 – CH2, 8 – 634b, 9 – OR).

За структурою міжгенного регіону 16S-23S рРНК досліджувані штами розподілено на різні ITS-типи (табл. 2). Так, за схожістю рестрикційних патернів ДНК, отриманих при застосуванні рестриктази *MspI* (сайт зв'язування – C[^]CGG), ризобії сої утворювали три ITS-типи (МІ–МІІІ). Слід наголосити, що всі інтенсивнорослі штами *B. japonicum* KB1, KC20, KC21, СК4 та K32 мали ідентичні профілі (фінгерпринти) ДНК та були віднесені до одного ITS-типу – МІ. Повільнорослі штами, які генерували різну кількість рестрикційних фрагментів ДНК, об'єднані нами у два ITS-типи. У фінгерпринтах штамів *B. japonicum* VKM B-1967 (USDA 6^T), 46, KC2, CH2 та 634б були на-



явні три фрагменти розміром 150, 220, 590 п.н., вони утворювали МІ ITS-тип. Унікальним патерном характеризувався штаб *B. japonicum* OR, який мав лише один спільний фрагмент (220 п.н.) із рештою повільнорослих штабів ризобій. Цей штаб віднесено до МІІІ ITS-типу.

Таблиця 2

ITS-типи, отримані під час ПЛР-RFLP аналізу 16S-23S рДНК штабів *B. japonicum* за використання рестриктази *MspI*

Table 2

ITS-types obtained during PCR-RFLP analysis of 16S-23S rDNA of *B. japonicum* strains using the restrictase *MspI*

Штаби мікроорганізмів	Розмір фрагментів (п.н.)	Кількість фрагментів	рДНК ITS-типи
<i>B. japonicum</i> KB1	110, 150, 220, 460	4	МІ
<i>B. japonicum</i> KC20	110, 150, 220, 460	4	МІ
<i>B. japonicum</i> KC21	110, 150, 220, 460	4	МІ
<i>B. japonicum</i> 1967 (USDA 6T)	150, 220, 590	3	МІІ
<i>B. japonicum</i> 46	150, 220, 590	3	МІІ
<i>B. japonicum</i> KC2	150, 220, 590	3	МІІ
<i>B. japonicum</i> CH2	150, 220, 590	3	МІІ
<i>B. japonicum</i> 6346	150, 220, 590	3	МІІ
<i>B. japonicum</i> OR	110, 140, 160, 220, 310	5	МІІІ
<i>B. japonicum</i> СК4	110, 150, 220, 460	4	МІ
<i>B. japonicum</i> K32	110, 150, 220, 460	4	МІ

Виявлений високий ступінь гетерогенності досліджуваних штабів бульбочкових бактерій сої за структурою ITS-регіону був підтверджений за використання для рестрикційного аналізу двох інших рестриктаз – *HaeIII* та *NdeII*, які впізнають відповідні сайти зв'язування – GG[^]CC та [^]GATC.

При розщепленні 16S-23S рДНК рестриктазою *HaeIII* у досліджуваних штабів, незалежно від швидкості їх росту, утворювалося три фрагменти ДНК (табл. 3). При цьому два фрагменти розміром 90 п.н. та 650 п.н. були виявлені в усіх штабів. Відрізнялися отримані патерни за розміром третього фрагменту, що дозволило віднести штаби до трьох ITS-типів. У штабів *B. japonicum* KB1, KC20, KC21, СК4, K32 (інтенсивнорослі) та VKM В-1967 (USDA 6^T) і 46 (повільнорослі) розмір цього фрагменту становив 120 п.н. – це МІ ITS-тип. Два штаби бульбочкових бактерій з повільним ростом – *B. japonicum* KC2 та 6346 об'єднані у МІІ ITS-тип. В їх рестрикційних профілях наявний фрагмент розміром 200 п.н. Лише штаб *B. japonicum* OR мав патерн із набором фрагментів: 90, 230, 650 п.н., і представляв МІІІ ITS-тип.



Таблиця 3
 ITS-типи, отримані під час ПЛР-RFLP аналізу 16S-23S рДНК штамів *B. japonicum* за використання рестриктази *HaeIII*

Table 3
 ITS-types obtained during PCR-RFLP analysis of 16S-23S rDNA of *B. japonicum* strains using the restrictase *HaeIII*

Штами мікроорганізмів	Розмір фрагментів (п.н.)	Кількість фрагментів	рДНК ITS-типи
<i>B. japonicum</i> KB1	90, 120, 650	3	НІ
<i>B. japonicum</i> KC20	90, 120, 650	3	НІ
<i>B. japonicum</i> KC21	90, 120, 650	3	НІ
<i>B. japonicum</i> 1967 (USDA 6T)	90, 120, 650	3	НІ
<i>B. japonicum</i> 46	90, 120, 650	3	НІ
<i>B. japonicum</i> KC2	90, 200, 650	3	НІІ
<i>B. japonicum</i> CH2	90, 120, 650	3	НІ
<i>B. japonicum</i> 6346	90, 200, 650	3	НІІ
<i>B. japonicum</i> OR	90, 230, 650	3	НІІІ
<i>B. japonicum</i> СК4	90, 120, 650	3	НІ
<i>B. japonicum</i> K32	90, 120, 650	3	НІ

Таблиця 4
 ITS-типи, отримані під час ПЛР-RFLP аналізу 16S-23S рДНК штамів *B. japonicum* за використання рестриктази *NdeII*

Table 4
 ITS-types obtained during PCR-RFLP analysis of 16S-23S rDNA of *B. japonicum* strains using the restrictase *NdeII*

Штами мікроорганізмів	Розмір фрагментів (п.н.)	Кількість фрагментів	рДНК ITS-типи
<i>B. japonicum</i> KB1	80, 100, 230, 300	4	МІ
<i>B. japonicum</i> KC20	80, 100, 230, 300	4	МІ
<i>B. japonicum</i> KC21	80, 100, 230, 300	4	МІ
<i>B. japonicum</i> 1967 (USDA 6T)	80, 120, 230, 300	4	МІІ
<i>B. japonicum</i> 46	80, 120, 230, 300	4	МІІ
<i>B. japonicum</i> KC2	100, 130, 230, 330	4	МІІІ
<i>B. japonicum</i> CH2	80, 120, 230, 300	4	МІІ
<i>B. japonicum</i> 6346	80, 100, 230, 330	4	МІV
<i>B. japonicum</i> OR	100, 230, 370	3	МV
<i>B. japonicum</i> СК4	80, 100, 230, 300	4	МІ
<i>B. japonicum</i> K32	80, 100, 230, 300	4	МІ



За використання ендонуклеази рестрикції *Nde*II досліджувані штами ризобій сої об'єднані у п'ять ITS-типів (NI-NV) (табл. 4). При цьому, усі штами бульбочкових бактерій з інтенсивним ростом – *B. japonicum* KB1, KC20, KC21, SK4 та K32 виявилися подібними за рестрикційними профілями і утворювали один ITS-тип – NI. Повільнорослі штами *B. japonicum* VKM B-1967 (USDA 6^T), 46, KC2, CH2 та 6346 були більш гетерогенними, вони утворювали чотири ITS-типи. Спільним для всіх досліджених штамів виявився фрагмент розміром 230 п.н.

Слід наголосити, що отримані результати щодо гетерогенності досліджених штамів *B. japonicum* підтверджуються літературними даними. Значне різноманіття бульбочкових бактерій – мікросимбіонтів сої в ґрунтових популяціях показано іншими дослідниками. Так, S. Sikoга із співавторами, за використання методів геномного фінгерпринтингу, встановили, що в агроценозах Хорватії бактерії виду *B. japonicum* мають істотні відмінності і належать до трьох генетичних груп [12]. ПЛР-RFLP аналіз 16S-23S рДНК ризобій сої, поширених в ґрунтах Кенії, дозволив віднести їх до тринадцяти ITS-типів. При цьому переважальними мікросимбіонтами сої виявились представники лише п'яти ITS-типів [14]. Бульбочкові бактерії, ізольовані з бульбочок сої, яку вирощували в різних ґрунтово-кліматичних регіонах Індії, віднесені С. Аррипу із співавторами до трьох ITS-груп і ідентифіковані як *B. liaoningense*, *B. uanmingensis* та *B. japonicum* *bv. glycinearum* [3].

Показано, що штами *B. japonicum*, поширені в ґрунтах України, належать до різних генетичних груп (табл. 5). Найбільші генетичні відмінності у досліджуваних ризобій відмічено за використання рестриктази *Nde*II – одинадцять штамів *B. japonicum* віднесено до п'яти ITS-типів.

Аналізуючи серологічне різноманіття штамів *B. japonicum* та їх відмінності за структурою ITS-регіону слід наголосити, що усі інтенсивнорослі штами, які є представниками однієї серогрупи KB11, виявилися подібними і утворювали гомогенну генетичну групу. Тоді як серологічно відмінні повільнорослі штами, які належать до п'яти серогруп (1967, 46, M8, 6346 та OR) є більш різнорідними і на молекулярно-генетичному рівні – вони формують від двох до чотирьох геномогруп, залежно від рестриктази.

Таким чином, на основі рестрикційних профілів 16S-23S рДНК досліджувані штами бульбочкових бактерій, виділені з агроценозів сої, віднесені до різних ITS-типів. Високий рівень поліморфізму виявлено у штамів *B. japonicum* з повільним ростом. За рестрикції ITS-регіону ферментом *Msp*I їх віднесено до двох генетичних груп, *Hae*III – до трьох, *Nde*II – до чотирьох геномогруп. На відміну від повільнорослих штамів, ризобії сої з інтенсивним ростом мали однакові рестрикційні профілі за використання кожної із трьох рестриктаз, у результаті чого їх об'єднано в одну генетичну групу.

Фенотипова та генотипова характеристика штамів *B. japonicum*
з різною швидкістю росту

Phenotypic and genotypic characteristics of *B. japonicum* strains
with different growth rates

Штами мікроорганізмів	Ріст на агаризованому середовищі	Серогрупа	рДНК ITS-типи за використання рестриктази:		
			<i>MspI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>NdeII</i>
<i>B. japonicum</i> KB1	Інтенсивний	KB11	MI	HI	MI
<i>B. japonicum</i> KC20		KB11	MI	HI	MI
<i>B. japonicum</i> KC21		KB11	MI	HI	MI
<i>B. japonicum</i> SK4	Інтенсивний	KB11	MI	HI	MI
<i>B. japonicum</i> K32		KB11	MI	HI	NI
<i>B. japonicum</i> 1967 (USDA 6T)	Повільний	1967	MPI	HI	MPI
<i>B. japonicum</i> 46		46	MPI	HI	MPI
<i>B. japonicum</i> CH2		46	MPI	HI	MPI
<i>B. japonicum</i> KC2		M8	MPI	HPI	MPI
<i>B. japonicum</i> 6346		6346	MPI	HPI	MIV
<i>B. japonicum</i> OR		OR	MPII	HPII	NV

Отримані дані щодо структури міжгенного регіону 16S-23S рДНК штамів *B. japonicum* важливі для розуміння формування різноманітності мікросимбіонтів сої в агроценозах цієї культури.

Д. В. Крутило

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного
производства НААН, ул. Шевченко, 97, Чернигов, 14027,
Украина, тел.: +38(04622) 3-17-49,
e-mail: krutylodv@gmail.com

**RFLP-АНАЛИЗ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ
ВИДА *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*,
РАСПРОСТРАНЕННЫХ В АГРОЦЕНОЗАХ
УКРАИНЫ**

Реферат

Цель. Исследовать генетическое разнообразие клубеньковых бактерий – микросимбионтов сои, распространенных в агроценозах Украины.
Методы. Клубеньковые бактерии выделяли из клубеньков сои, которую выращивали на образцах почвы, отобранных в различных регионах Украины.



Амплификацию межгенного региона 16S-23S рРНК (ITS-регион) проводили с использованием праймеров FGPS1490-72 и FGPL132-38. Для рестрикции ПЦР-продуктов применяли эндонуклеазы рестрикции *MspI*, *HaeIII* и *NdeII*. **Результаты.** С использованием метода ПЦР-RFLP исследовано разнообразие штаммов *Bradyrhizobium japonicum* с разной скоростью роста. Анализ 16S-23S рДНК с использованием рестриктаз *MspI*, *HaeIII* и *NdeII* показал, что все интенсивнорастущие штаммы имели одинаковые рестрикционные профили, на основании чего они объединены в одну генетическую группу. На основании рестрикции ITS-региона медленно растущих штаммов ферментом *MspI* они отнесены к двум генетическим группам, *HaeIII* – к трем, *NdeII* – к четырём геномогруппам. **Выводы.** Обнаружена высокая гетерогенность штаммов *B. japonicum*, выделенных из агроценозов сои. По структуре межгенного региона они отнесены к разным ITS-типам. Медленно растущие штаммы оказались более разнородными, по сравнению со штаммами с интенсивным ростом, которые образовывали гомогенную геномогруппу.

Ключевые слова: *Bradyrhizobium japonicum*, генетический полиморфизм, ITS-регион, RFLP-анализ, соя.

D. V. Krutylo

Institute of Agricultural Microbiology and Agro-industrial Manufacture, National Academy of Agrarian Sciences; 97 Shevchenko St., Chernihiv, 14027, Ukraine, tel.: +38(04622) 3-17-49, e-mail: krutylodv@gmail.com

RFLP-ANALYSIS OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* NODULE BACTERIA, WIDESPREAD IN AGROCENOSIS OF UKRAINE

Summary

Aim. To investigate the genetic diversity of soybean nodule bacteria, widespread in agroecosystems of Ukraine. **Methods.** Nodule bacteria were isolated from soybean nodules grown in soil samples selected in different regions of Ukraine. The amplification of the intergenic region 16S-23S rRNA (ITS-region) was conducted with the use of primers FGPS1490-72 and FGPL132-38. For PCR-products restriction there were applied restriction endonucleases *MspI*, *HaeIII* and *NdeII*. **Results.** The diversity of *Bradyrhizobium japonicum* strains with different growth-rates was investigated using PCR-RFLP method. According to analysis of 16S-23S rDNA with enzymes *MspI*, *HaeIII* and *NdeII* it was obtained that all the intensive-growing strains had the same restriction profiles, so they were combined into a single genetic group. Based on ITS-region restriction the slow-growing strains were assigned into two genetic groups using *MspI* enzyme, three genetic groups using *HaeIII* and four genogroups using *NdeII* enzyme. **Conclusions.** High heterogeneity of *B. japonicum* strains allocated from soybean agroecosystems was found. They belong to different ITS-types according to the structure of intergenic region. Slow-growing strains used to be more heterogeneous, in comparison with more intensive-growth strains, which formed a homogeneous genogroup.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, genetic polymorphism, ITS-region, RFLP-analysis, soybean.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Патики В. П., Коць С. Я., Волкогон В. В. та ін. Біологічний азот / за ред. В. П. Патики. К.: Світ, 2003. – 424 с.
2. Патики В. П., Крутило Д. В., Наджернична О. В., Ковалевська Т. М. та ін. Фенотипні та генотипні ознаки бульбочкових бактерій сої, поширених у ґрунтах України // Доповіді НАН України – 2010. – № 8. – С. 167–172.
3. Appunu C., N'Zoue A., Laguerre G. Genetic diversity of native bradyrhizobia isolated from soybeans (*Glycine max* L.) in different agricultural-ecological-climatic regions of India // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – 74 (19). P. 5991–5996.
4. Chen W. X., Wang E. T., Li Y. B., Chen X. Q., Li Y. Characterization of *Rhizobium tianshanense* sp. nov. moderately and slowly growing nodule bacterium isolated from an acid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1995. – 45. – P. 153–159.
5. Jordan D. Notes: Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1982. – 32. – P. 136–139.
6. Krutylo D. V., Zotov V. S. Genotypic analysis of nodule bacteria nodulating soybean in soils of Ukraine // Russian Journal of Genetics: Applied Research – 2015. – Vol. 5, № 2. – P. 102–109.
7. Kuykendall L., Saxena B., Devine T., Udell S. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. // Can. J. Microbiol. 1992. – 38. – P. 501–505.
8. Naamalaa J., Jaiswalb S. K., Dakora F. D. Microsymbiont diversity and phylogeny of native bradyrhizobia associated with soybean (*Glycine max* L. Merr.) nodulation in South African soils // Systematic and Applied Microbiology – 2016. – 39. – P. 336–344.
9. Normand P., Ponsonnet C., Nesme X. et al. ITS analysis of prokaryotes // Mol. Microbial Ecology Manual – 1996. – Vol. 5, № 3.4. – P. 1–12.
10. Peng G. X., Tan Z. Y., Wang E. T., Reinhold-Hurek B., Chen W. F., Chen W.X. Identification of isolates from soybean nodules in Xinjiang Region as *Sinorhizobium xinjiangense* and genetic differentiation of *S. xinjiangense* from *Sinorhizobium fredii* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2002. – 52. – P. 457–462.
11. Ponsonnet C., Nesme X. Identification of Agrobacterium strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions // Arch. Microbiol. – 1994. – Vol. 161. – P. 300–309.
12. Sikora S, Redzepović S. Genotypic characterization of soybean rhizobia // Food Technol. Biotechnol. – 2003. – 41. – P. 61–67.
13. Spaink H., Kondorosi A., Hooykaas P. / Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria / Рус. пер. И.А. Тихоновича и Н.А. Проворова. – С.-Петербург: Бионт, 2002. – 568 с.
14. Wasike V. W., Lesueur D., Wachira F. N., Mungai N. W. et al. Genetic diversity of indigenous Bradyrhizobium nodulating promiscuous soybean [*Glycine max* (L) Merr.] varieties in Kenya: impact of phosphorus and lime fertilization in two contrasting sites // Plant Soil. –2009. – Vol. 322. – P. 151–163.



15. Xu L.M., Ge C., Cui Z., Li J., Fan H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybeans // *Int. J. Syst. Bact.* – 1995. – 45. – P. 706–711.

16. Yao Z.Y., Kan F.L., Wang E.T., Wei G.H., Chen W.X. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2002. – 52. – P. 2219–2230.

References

1. Patyka VP, Kots' SYa, Volkohon VV ta in. *Biologichnyy azot / za red. VP Patyky. K.: Svit, 2003. 424 p. (in Ukrainian).*

2. Patyka VP, Krutylo DV, Nadkernychna OV, Kovalevs'ka TM ta in. Fenotypni ta henotypni oznaky bul'bochkovykh bakteriy soyi, poshyrenykh u gruntakh Ukrayiny // *Dopovidi NAN Ukrayiny. 2010. (8): 167–172. (in Ukrainian).*

3. Appunu C, N'Zoue A, Laguerre G. Genetic diversity of native bradyrhizobia isolated from soybeans (*Glycine max* L.) in different agricultural-ecological-climatic regions of India. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74 (19): 5991–5996.

4. Chen WX, Wang ET, Li YB, Chen XQ, Li Y. Characterization of *Rhizobium tianshanense* sp. nov. moderately and slowly growing nodule bacterium isolated from an acid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995; 45: 153–159.

5. Jordan D. Notes: Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1982; 32: 136–139.

6. Krutylo DV, Zotov VS. Genotypic analysis of nodule bacteria nodulating soybean in soils of Ukraine. *Russian Journal of Genetics: Applied Research.* 2015; 5 (2): 102–109.

7. Kuykendall L, Saxena B, Devine T, Udell S. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 1992; 38: 501–505.

8. Naamalaa J, Jaiswal SK, Dakora FD. Microsymbiont diversity and phylogeny of native bradyrhizobia associated with soybean (*Glycine max* L. Merr.) nodulation in South African soils. *Systematic and Applied Microbiology.* 2016; 39: 336–344.

9. Normand P, Ponsonnet C, Nesme X et al. ITS analysis of prokaryotes. *Mol. Microbial Ecology Manual.* 1996; 5 (3.4): 1–12.

10. Peng GX, Tan ZY, Wang ET, Reinhold-Hurek B, Chen WF, Chen WX. Identification of isolates from soybean nodules in Xinjiang Region as *Sinorhizobium xinjiangense* and genetic differentiation of *S. xinjiangense* from *Sinorhizobium fredii*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002; 52: 457–462.

11. Ponsonnet C, Nesme X. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. *Arch. Microbiol.* 1994; 161: 300–309.

12. Sikora S, Redzepović S. Genotypic characterization of soybean rhizobia. *Food Technol. Biotechnol.* 2003; 41: 61–67.



13. Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas P. The Rhizobiaceae: Molecular biology of model plant-associated bacteria. Translated in rus. by I.A. Tikhonovich, N.A. Provorov. St.-Petersburg: Biont, 2002. 568 p. (in Russian).

14. Wasike VW, Lesueur D, Wachira FN, Mungai NW et al. Genetic diversity of indigenous *Bradyrhizobium* nodulating promiscuous soybean [*Glycine max* (L) Merr.] varieties in Kenya: impact of phosphorus and lime fertilization in two contrasting sites. *Plant Soil*. 2009; 322: 151–163.

15. Xu LM, Ge C, Cui Z, Li J, Fan H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bact.* 1995; 45: 706–711.

16. Yao ZY, Kan FL, Wang ET, Wei GH, Chen WX. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002; 52: 2219–2230.

Стаття надійшла до редакції 09.10.2017 р.

