

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМ. А.Н. БАХА

На правах рукописи

Хапчаева Софья Арсеновна

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ МАРКИРОВАНИЕ КЛУБЕНЬКОВЫХ
БАКТЕРИЙ И СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ
БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА**

03.02.03 – микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Топунов А.Ф.

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В РАБОТЕ	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1. Специфичность растительно-микробных взаимодействий.....	11
2. Генетические основы клубенькообразования у бобовых растений.....	15
2.1. Сигнальные процессы бобово-ризобияльного симбиоза. Nod-факторы.....	15
2.2. Плазмидный профиль клубеньковых бактерий. Симбиотические гены.....	16
3. Таксономия и описание клубеньковых бактерий.....	18
4. Биоразнообразие симбиотических бактерий порядка Rhizobiales и детектирующие его методы.....	22
5. Способы повышения эффективности бобово-ризобияльного симбиоза.....	26
5.1. Бактериальные препараты на основе почвенных микроорганизмов для агробиотехнологии.....	26
5.2. Микробные биопрепараты на основе консорциумов полезных почвенных микроорганизмов с микроводорослями.....	27
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	30
1. Объекты исследования.....	30
1.1. Клубеньковые бактерии.....	30
1.2. Сельскохозяйственные бобовые культуры.....	30
1.3. Клубенек-образующие единицы (КлОЕ).....	31
1.4. Штаммы микроводорослей и цианобактерий.....	31
2. Методы исследования.....	32
2.1. Культивирование микроорганизмов.....	32
2.2. Выделение ДНК.....	32
2.3. Генотипирование бактерий.....	33
2.4. Фингерпринтинг saAFLP с использованием эндонуклеаз рестрикции.....	35
2.5. Методы лабораторного и полевого вегетационных опытов.....	35
2.6. Метагеномное секвенирование нового поколения (NGS).....	36
2.7. Полногеномное секвенирование.....	37
2.8. Биоинформационный и статистический анализ.....	37
2.9. Анализ общего содержания белка.....	37

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	38
1. Изучение биоразнообразия микросимбионтов бобовых культур	38
1.1. Клубеньковые бактерии ГПИ трибы <i>Viciae</i> (<i>Vicia</i> , <i>Pisum</i> , <i>Lens</i> , <i>Lathyrus</i>).....	39
1.1.1. Генетический полиморфизм хромосомных генов 16S рРНК и <i>rpoB</i>	39
1.1.2. Генетический полиморфизм симбиотического гена <i>nodD</i>	41
1.1.3. Генетический полиморфизм хромосомного межгенного <i>hin</i> -региона	42
1.2. Клубеньковые бактерии – симбионты фасоли (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	47
1.2.1. Генетический полиморфизм хромосомных генов 16S рРНК и <i>rpoB</i>	47
1.2.2. Генетический полиморфизм симбиотических генов <i>nodC</i> и <i>nifH</i>	49
1.2.3. Генетический полиморфизм хромосомного межгенного <i>hin</i> -региона	51
1.2.4. Оценка внутривидового полиморфизма при помощи saAFLP	57
1.3. Клубеньковые бактерии – симбионты сои (<i>Glycine max</i>)	59
1.3.1. Генетический полиморфизм хромосомных маркеров	59
1.3.2. Генетический полиморфизм симбиотических генов <i>nodC</i> и <i>nifH</i>	61
1.3.3. Оценка внутривидового полиморфизма при помощи saAFLP	63
1.4. Уровень нуклеотидного полиморфизма маркеров ризобий симбионтов фасоли, сои и растений ГПИ трибы <i>Viciae</i>	64
2. Выявление сорт-штаммовой специфичности в условиях лабораторного опыта.....	66
2.1. Вегетационные испытания на растениях <i>Pisum sativum</i> и <i>Vicia faba</i>	66
2.2. Вегетационные испытания на <i>Phaseolus vulgaris</i> (фасоль обыкновенная)	70
2.3. Вегетационные испытания на сое (<i>Glycine max</i>).....	75
3. Изучение эффективности действия и стабильности состава консорциумов полезных микроорганизмов (во времени)	78
4. Проверка эффективности азотфиксирующего симбиоза в условиях полевого опыта. 81	
4.1. Специфичность симбиотических взаимодействий бактерий рода <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> с растениями трибы <i>Viciae</i>	81
4.2. Эффективность взаимодействия растений фасоли с ризобиями различных генотипов.....	88
4.3. Персонализированные формулы биопрепаратов на примере симбиоза с различными сортами сои	93
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	96
ВЫВОДЫ.....	97

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	98
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	99
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	101
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	117
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	121
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	124

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В РАБОТЕ

- ПС – питательная среда
- ITS (internal transcribed spacer) – межгенный регион рибосомального кластера, расположенный между генами *16S* и *23S* рРНК
- saAFLP - single adapter Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis
- п.о. – пара оснований
- ГПИ – группа перекрестной инокуляции
- ГПГ – горизонтальный перенос генов
- Mb (Mega base) – миллион пар оснований
- GC% – GC-состав (гуанин-цитозиновый состав, ГЦ-состав, %)
- SDS – додецилсульфат натрия
- ПААГ – полиакриламидный гель
- СТАВ – цетилтриметиламмонийбромид, цетавлон
- ТАЕ-буфер – буфер, содержащий Трис, ацетат и ЭДТА
- Трис – триоксиметиламинометан
- ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
- RFLP – анализ полиморфизма длины фрагментов рестрикции
- Neighbor-Joining NJ – метод присоединения соседей
- Maximum likelihood estimation – метод максимального правдоподобия
- ЦФ – центрифугирование
- w/v – вес/объем, вес на единицу объема
- ВНИИЗБК – ФГБНУ «Федеральный научный центр зернобобовых и крупяных культур»
- ВИМ – ФГБНУ «Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ»

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. В настоящее время растительно-микробные взаимодействия, в частности бобово-ризобиальный симбиоз, изучены достаточно широко мировым научным сообществом. Выявлены и охарактеризованы генетические основы и молекулярные механизмы, определена значимость подобных систем для изучения ряда фундаментальных и прикладных вопросов биологии. Однако, в выявлении специфичности растительно-микробных взаимодействий остается много вопросов. До конца не понятно влияние внешних и внутренних биотических факторов, определяющих симбиоз между конкретными растениями семейства Бобовые (Fabaceae) и штаммами различных родов семейства Rhizobiaceae из общего пула почвенных микроорганизмов, что на практике не позволяет полностью использовать природный потенциал таких взаимодействий.

Для оценки специфичности растительно-микробных взаимодействий важную роль играют идентификация и дифференциация микросимбионтов - ризобиальных культур. Генотипирование позволяет выявить группы штаммов (генотипы ризобий), обладающие различной нодуляционной конкурентоспособностью – способностью формировать клубеньки в присутствии других вирулентных штаммов [Онищук с соавт., 2017].

Новые описанные виды клубеньковых бактерий периодически пересматриваются Международным комитетом по систематике прокариот (Подкомитет по таксономии агробактерий и ризобий, ICSP Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium* - <http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy/>). Было опубликовано несколько обзоров по ризобиальной таксономии [Zakhia et al., 2001; Sawada et al., 2003; Willems, 2006], но ни один из них не был специально ориентирован на геномику. Даже с применением современных молекулярно-генетических методик достаточно сложно однозначно разделять уже известные виды клубеньковых бактерий, реклассифицировать их или вводить и описывать новые [Rao et al., 2018]. Вследствие этого актуальным является поиск генетических маркеров, позволяющих идентифицировать и дифференцировать ризобии на внутривидовом уровне.

Один и тот же генотип (группа штаммов) ризобий может вступать в симбиоз с разными сортами бобового растения с неодинаковой эффективностью [Волобуева с соавт., 2016]. Оценка биоразнообразия ризобиальных штаммов позволяет расширить имеющиеся знания в области специфичности бобово-ризобиального симбиоза и создавать микробные биопрепараты, наиболее полно раскрывающие природный потенциал сорта и повышающие эффективность растительно-микробных взаимодействий.

Цель работы: повысить эффективность бобово-ризобиального симбиоза посредством разработки персонализированных формул полифункциональных биопрепаратов.

Задачи:

1. Изучить биоразнообразие микросимбионтов бобовых культур: фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*), сои культурной (*Glycine max*) и растений трибы Viciae (*Vicia, Pisum, Lens, Lathyrus*) при помощи анализа данных мультилокусного секвенирования (MLSA) и saAFLP.

2. Определить уровень генетического полиморфизма по каждому из маркеров (генов 16S рРНК, *rpoB, nodD, nodC, nifH*; межгенного региона 16-23S рРНК), в т.ч. провести сравнительную оценку структуры и полиморфизма *hin*-региона.

3. Изучить в рамках лабораторных испытаний особенности бобово-ризобиального симбиоза, как предпосылку сорт-штаммовой специфичности.

4. Оценить возможность использования микроводорослей и цианобактерий при создании консорциумов полезных микроорганизмов, их влияние на эффективность действия и стабильность состава таких биопрепаратов в процессе хранения.

5. Апробировать в рамках полевых опытов гипотезу создания персонализированных формул биопрепаратов под бобовые культуры.

Научная новизна. Впервые проведена сравнительная оценка структуры и полиморфизма *hin*-региона для всех известных на настоящее время микросимбионтов фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) и растений трибы Viciae. Существенно расширена база данных по *hin*-региону и проведена ревизия таксономического положения исследуемых штаммов рода *Rhizobium*, что подтверждает перспективность использования данного маркера в бактериальной систематике и таксономии.

В ходе изучения специфичности бобово-ризобиальных взаимодействий на примере растений трибы Viciae впервые была выявлена сцепленность хромосомного маркера *hin*-региона с плазмидным *nodD*-геном штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. При анализе тотальной ДНК клубеньков с использованием *hin*-регион ПЦР для симбионтов растений трибы Viciae впервые был выявлен генотип - HF (Heavy Fragment), присутствующий у аборигенных ризобий, обладающих повышенной конкурентоспособностью. Изолят с новым генотипом был выделен в чистую культуру и для него было проведено полногеномное секвенирование.

В рамках полевых испытаний показана фенотипическая изменчивость фасоли обыкновенной (расщепление морфотипа семян по цвету, форме и содержанию белка), вероятно связанная с генотипами интродуцированных штаммов клубеньковых бактерий,

что в свою очередь принципиально влияет не только на количество, но и качество урожая данной культуры.

Впервые предложен и научно обоснован способ повышения эффективности бобово-ризобиального симбиоза посредством разработки персонализированных формул полифункциональных биопрепаратов.

Практическая значимость работы. Предложенные в работе экспресс-методики идентификации и дифференциации штаммов клубеньковых бактерий в совокупности с вегетационными испытаниями позволяют выявлять перспективные штаммы для использования в качестве основы для биопрепарата под бобовые культуры.

В ходе работы были определены перспективные штаммы, наиболее эффективно вступающих в азотфиксирующий симбиоз с горохом и соей, и депонированы во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов (ВКПМ В-12661, ВКПМ В-12660). Получены патенты на штаммы, как на ризобиальные компоненты микробного биопрепарата.

В рамках лабораторного опыта было доказано влияние добавления микроводорослей или цианобактерий в биопрепарат на стабильность его действия.

Проводимая в рамках диссертации научно-исследовательская работа легла в основу разработки биотехнологии получения микробных полифункциональных препаратов, поддержанной грантами Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (конкурсы «УМНИК», «СТАРТ-1», «Развитие»), Фонда поддержки научно-практической деятельности студентов, аспирантов и молодых ученых «Национальное интеллектуальное развитие» (конкурс «Эврика!Концепт») и Инновационного центра Сколково (конкурс «Агрогенетика - 2016»).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Генетический маркер *hin*-регион – перспективный таксономический маркер для идентификации и оценки внутривидового разнообразия бактерий рода *Rhizobium* и выявления сорт-штаммовой специфичности бобово-ризобиального симбиоза.
2. Применение микроводорослей и цианобактерий при создании консорциумов полезных микроорганизмов приводит к стабилизации состава комплексного биопрепарата.
3. Предложен способ повышения эффективности бобово-ризобиального симбиоза посредством разработки персонализированных формул полифункциональных биопрепаратов.

Апробация работы. Результаты работы были доложены на следующих конференциях: Международная школа-конференция молодых ученых «Растительно-микробные сообщества: молекулярные основы адаптивного потенциала», (Крым, Алушта, 2012), устный доклад; 17-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», (Пушино, Россия, 2013), устный доклад; 12th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology (BAGECO12), (Ljubljana, Slovenia, 2013), постерный доклад; 42nd Annual meeting ESNA 2013, (Thessaloniki, ELLAS (Greece), 2013), постерный доклад; XIII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, (Украина, Ялта, 2013), устный доклад; 18-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», (Пушино, Россия, 2014), устный доклад; 43rd Annual meeting ESNA 2014, (Bolzano, Italy, 2014), постерный доклад; 11th European Nitrogen Fixation Conference, (Tenerife, Canary Islands, Spain, 2014), постерный доклад; 44th Annual meeting ESNA 2015, (Brno, Czech Republic, 2015), постерный доклад; X Молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», (Москва, Россия, 2015), постерный доклад; III Международная научная конференция «Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки» (г. Ялта, Республика Крым, Россия, 2018), устный доклад.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 2 статьи в журналах, входящих в базы Web of Science и Scopus; 2 патента, 5 статей в журналах, входящих в базу РИНЦ; и 1 публикация в других периодических изданиях и сборниках; а также 12 тезисов в материалах отечественных и международных конференций.

Объем и структура работы. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждения, заключение, перечень публикаций по теме диссертации и списка литературы. Работа изложена на 125 страницах текста, иллюстрирована 36 рисунками, включает 22 таблицы. Список литературы состоит из 176 источников, из них 162 зарубежных авторов.

Личный вклад диссертанта. Диссертантом проведены основная часть экспериментальных работ, представленных в диссертации, обработка полученных данных, подготовка материалов к публикациям, докладам и выступлениям и написание текста диссертационной работы.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю д.б.н. Топунову А.Ф. за руководство и помощь на всех этапах работы, к.б.н. Зотову В.С. за всестороннюю поддержку, консультации и методологическую помощь при выполнении исследовательской деятельности. Также автор выражает благодарность за помощь

сотрудникам лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота и группы альгобиотехнологии ФИЦ Биотехнологии РАН.

Автор глубоко признателен к.с-х.н. Дидович С.В. за предоставленную микробиологическую коллекцию, а также Наумкиной Т.С., Суровой Г.Н. и Васильчикову А.Г. за предоставленные сорта и сортообразцы бобовых культур и помощь в проведении апробации бипрепаратов в полевых опытах.

Автор выражает искреннюю благодарность руководству ФИЦ Биотехнологии РАН в лице Попова В.О. и Садыхова Э.Г. за всестороннюю поддержку данной тематики исследований, а также Технологической платформе «БиоТех 2030», в лице исполнительного директора Осьмаковой А.Г., за помощь в продвижении проекта.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Специфичность растительно-микробных взаимодействий

Бобово-ризобиальный симбиоз, в основе которого лежит молекулярный сигнальный обмен между растением и микроорганизмом, является высокоспецифичным, и только определенные клубеньковые бактерии способны вступать в эффективные diaзотрофные симбиозы с конкретным представителем из семейства Бобовые [Denarie et al. 1996; Long 1996; Oldroyd et al. 2011]. Существуют также менее специфичные симбиозы, например, в случае некоторых тропических бобовых растений, неразборчивых в выборе микросимбионта [Martinez-Romero 2003; Perret et al. 2000], или в случае некоторых ризобий, которые обладают набором генов клубенькообразования, специфичных для множества различных растений [Perret et al. 2000].

С прикладной точки зрения, понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе симбиотической специфичности, может привести к повышению уровня сельскохозяйственных практик выращивания бобовых растений без необходимости существенных вложений. Было подтверждено, что возделываемые виды сельскохозяйственных культур, как правило, имеют меньше микросимбионтов (более высокую специфичность), чем их дикие аналоги [Mutch and Young, 2004]. Такое ограничение может привести к снижению урожайности в почвах, где нет требуемых штаммов ризобий. С другой стороны, даже несмотря на то, что многие бобовые могут быть нодулированы местными почвенными бактериями, эффективность фиксации азота значительно варьируется между различными комбинациями макро- и микросимбионтов [Schumpp and Deakin, 2010]. Знание генетического контроля специфичности симбиоза улучшит способность предсказывать и управлять ключевыми генетическими факторами, контролирующими симбиотические взаимодействия, и позволит исследователям разрабатывать новые сорта сельскохозяйственных культур или новые ризобиальные штаммы, которые способны повысить агрономический потенциал азотфиксирующего симбиоза.

Семейство Бобовые (Leguminosae) насчитывает около 700 родов и более 19500 видов и является третьим по количеству видов после семейств Астровые (Asteraceae) и Орхидные (Orchidaceae). С точки зрения экономической значимости бобовые являются вторыми после злаковых (Poaceae). В соответствии с филогенией, принятой в настоящее время, семейство Leguminosae разделяется на подсемейства Caesalpinioideae DC.; Cercidoideae DC., Detarioideae DC., Dialioideae DC., Duparquetioideae DC. (клада Мимозовые, Mimosoideae); и Papilionoideae DC (рис. 1). Основные сельскохозяйственные бобовые культуры входят в состав подсемейства Papilionoideae DC.

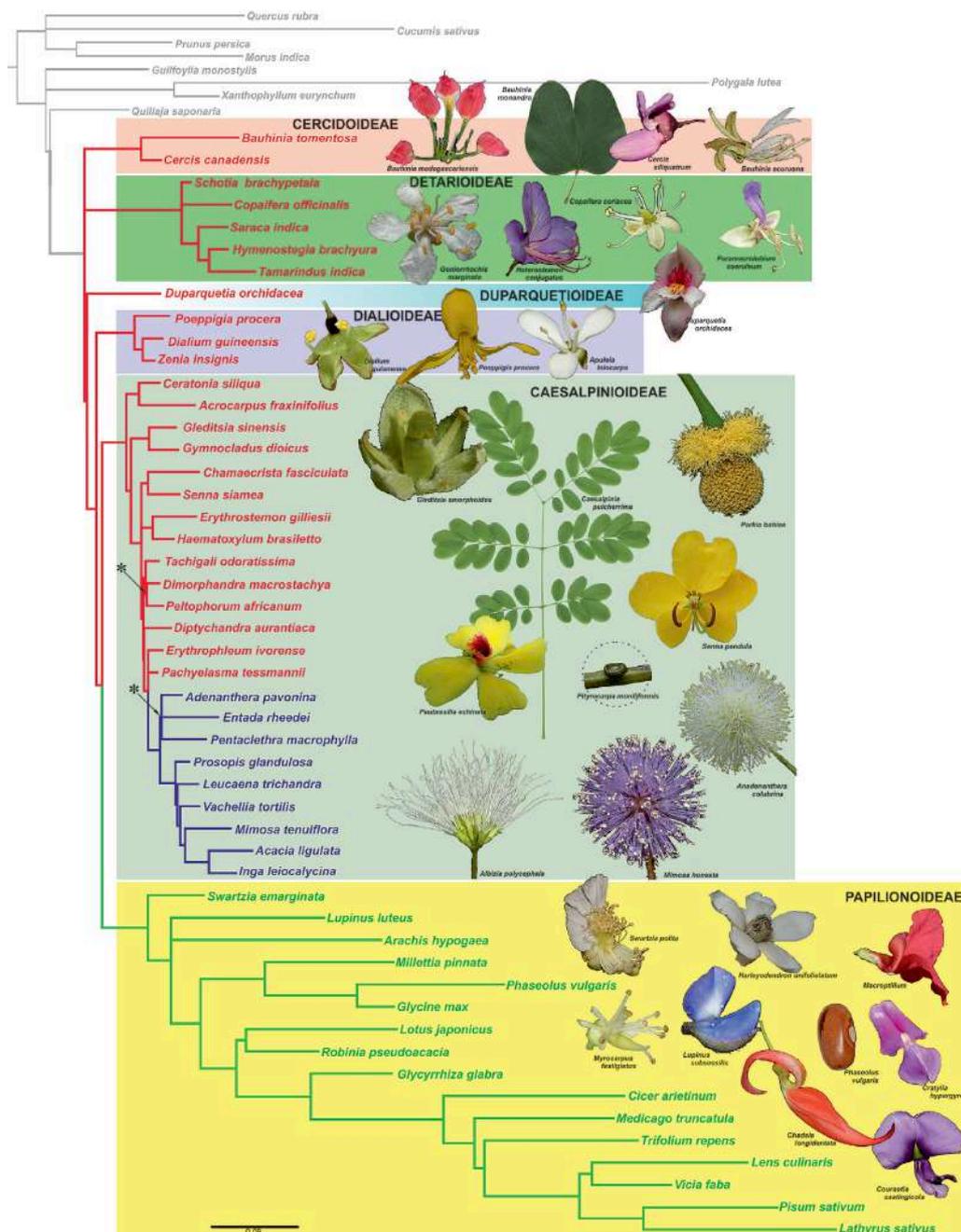


Рисунок 1. Филогения и классификация подсемейств Leguminosae на основе анализа пептидных последовательностей 81 белка, кодируемых пластидами. Иллюстрация из материалов международной рабочей группы по филогении бобовых культур, 2017 (LPWG. Phylogeny and classification of the Leguminosae).

Растения трибы Viciae, а именно различные виды гороха (*Pisum sativum*), бобов (*Vicia faba*), чечевицы (*Lens culinaris*) и чины (*Lathyrus sativus*), способны вступать в эффективный симбиоз с клубеньковыми бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Данные бактерии содержат один набор генов азотфиксации, расположенных на плазмиде, ответственной за симбиотический генотип – *Sym*-плазмиды [Young et al. 2006]. За некоторыми исключениями [Mutch et al. 2003], большинство изолятов *R. leguminosarum* bv. *viciae*, содержащих *Sym*-плазмиду, способны эффективно нодулировать представителей

всех четырех указанных выше растений, образуя группу перекрестной инокуляции (ГПИ). Однако было высказано предположение, что среди бактерий *R. leguminosarum* bv. *viciae* существуют генотипы, которые лучше приспособлены к конкретным растениям и которые растение предпочитает и выбирает из общего пула почвенных микроорганизмов, что характеризует специфичность бобово-ризобияльного симбиоза [Depret et al. 2004; Laguerre et al. 2003; Louvrier et al. 1996; Mutch and Young 2004; Palmer and Young 2000].

В настоящее время известны следующие ризобияльные микросимбионты данных растений: *R. pisi* [Ramírez-Bahena et al., 2008], *R. fabae* [Tian et al., 2009], *R. anhuiense* [Zhang et al., 2015], *R. laguerreae* [Saïdi et al., 2014].

Фасоль обыкновенную (*Phaseolus vulgaris*) можно рассматривать как уникальную модель для изучения эволюции культур и, в частности, для понимания эволюции и изменчивости микросимбионтов. Почти уникальная ситуация, которая характерна для рода *Phaseolus*, состоит в том, что пять из более чем 70 видов были окультурены (*P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. dumosus*, *P. acutifolius* и *P. lunatus*). Для *P. vulgaris* и *P. lunatus* дикие формы распространены как в Центральной, так и в Южной Америке, где произошло по меньшей мере два независимых и изолированных процесса окультуривания. Адаптация фасоли к различным условиям не только в центрах происхождения, но и за пределами Северной и Южной Америки, после внедрения и широкого распространения в различных странах, в частности, для *P. vulgaris*, привело к разрыву пространственной изоляции мезоамериканского и андского генных пулов, что способствовало возможности образования новых генотипов и фенотипов [Rendón-Anaya et al., 2017, Bitocchi et al., 2017]. Соответственно, в процессе адаптации к контрастным агроклиматическим условиям, происходило увеличение разнообразия микросимбионтов среди пула почвенных микроорганизмов:

- ризобии вида *R. etli* преобладают в Средней и Южной Америке [Amarger, 2001] и Иордании [Tamimi and Young, 2004];
- ризобии вида *R. leguminosarum* - в Андском регионе и Непале [Bernal and Graham, 2001; Adhikari et al., 2013; Ribeiro et al., 2013];
- ризобии вида *R. tropici* - в регионах с кислыми почвами и высокими температурами [Martínez-Romero et al., 1991; Anyango et al., 1995; Grange, Hungria, 2004];
- ризобиями видов *R. phaseoli*, *R. etli* и другими новыми видами *Rhizobium* sp. - в Африке [Aserse et al., 2012].

Согласно литературным данным, способностью нодулировать фасоль обладают различные виды следующих родов клубеньковых бактерий:

- *Rhizobium* sp. (*R. etli*, *R. tropici*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. gallicum*, *Pararhizobium giardinii* [Mousavi et al., 2015], *R. lusitanum* [Valverde et al., 2006], *R. phaseoli*, *R. azibense* [Mnasri et al., 2014], *R. freirei* [Dall'Agnol et al., 2013], *R. mesoamericanum* [Lopez-Lopez et al., 2012], *R. vallis* [Wang et al., 2011], *R. acidisoli* [Román-Ponce et al., 2016], *R. tibeticum* [Hou et al., 2009], *R. leucaenae* [Ribeiro et al., 2012], *R. hidalgonense* [Yan et al., 2017], *R. tropici* type B, *R. aethiopicum* [Aserse et al., 2017], *R. anhuense*, *R. esperanzae* [Cordeiro et al., 2017], *R. ecuadorensis* [Ribeiro et al., 2015]);
- *Sinorhizobium* sp. (*Sinorhizobium meliloti* [Zurdo-Pineiro et al., 2009], *Sinorhizobium americanum* [Mnasri et al., 2012]);
- *Bradyrhizobium* sp. [Han et al., 2005].

Соя (*Glycine max*) является самой распространенной бобовой культурой в мире и занимает первое место по площади возделывания, что составляет 80% от общей площади земель под бобовыми. Свое происхождение соя ведет из северо-восточного Китая и в настоящее время культивируется во всем мире в различных климатических условиях. К микросимбионтам сои относят различные бактерии (быстро- и медленнорастущие) родов *Bradyrhizobium* sp., *Sinorhizobium* sp. (Ensifer) и *Mesorhizobium* sp.

Десятилетиями считалось, что соя может образовывать клубеньки только в ассоциации с *Bradyrhizobium japonicum* [Rhodíguez-Navarro et al., 2010]. Однако, со временем было выявлено, что соя может быть нодулирована различными видами *Bradyrhizobium* sp., а также *Rhizobium* sp., *Mesorhizobium* sp. и *Sinorhizobium fredii* [Biate et al., 2014]. Соевые микросимбионты включают как медленнорастущие ризобии (*Bradyrhizobium* spp.), так и быстрорастущие ризобии (*R. tropici*, *R. oryzae* и *M. tianshanense*) [Neves and Rumjanek, 1997; Hungria et al., 2001; Biate et al., 2014].

Согласно de Almeida Ribeiro et al. (2015), в настоящее время в литературе описаны следующие виды *Bradyrhizobium*: *B. japonicum*, *B. elkanii*, *B. liaoningense*, *B. yuanmingense*, *B. betae*, *B. canariense*, *B. denitrificans*, *B. pachyrhizi*, *B. jicamae*, *B. iriomotense*, *B. cytisi*, *B. lablabi*, *B. daqingense*, *B. huanghuaihaiense*, *B. oligotrophicum*, *B. rifense*, *B. arachidis*, *B. retamae*, *B. diazoefficiens*, *B. ganzhouense*, *B. paxllaeri*, *B. icense*, *B. manausense*, *B. ingae*, *B. valentinum*, *B. neotropicale*, *B. ottawaense*, *B. erythrophlei*, *B. ferriligni*. Эффективность симбиотической азотфиксации сои зависит от штамма ризобии, который образует клубеньки. Ризобияльные штаммы различаются по их способности к клубенькообразованию, эффективности фиксации азота, совместимости с различными культурами и адаптации к местным условиям окружающей среды [Biate et al., 2014].

2. Генетические основы клубенькообразования у бобовых растений

2.1. Сигнальные процессы бобово-ризобияльного симбиоза. *Nod*-факторы

Образование клубеньков, как основной этап бобово-ризобияльного симбиоза, представляет собой многоступенчатый процесс, который был детально изучен как со стороны растения [Gage, 2004; Kouchi et al., 2010], так и со стороны микросимбионта [Jones et al., 2007; Oldroyd and Downie, 2008].

Одними из основных факторов, обуславливающих специфичность бобово-ризобияльного симбиоза, являются *Nod*-факторы в виде липохитоолигосахаридов. синтезируемых и выделяемых ризобиями в ответ на сигналы растений, обычно флавоноиды (рис. 2) [Mergaert et al., 1997]. Известно, что различные ризобии синтезируют *Nod*-факторы, характеризующиеся различной длиной цепи хитоолигосахарида, длиной и степенью насыщения жирных кислот [D'Haese and Holsters, 2002]. Индукторы флавоноидов, полученные из растений-хозяев, способствуют прикреплению ризобии к молодым растущим корневым волоскам бобового растения. В сосудистых растениях было выявлено более 4000 различных флавоноидов, некоторые из них способствуют проявлению специфичности растений-хозяев [Perret et al., 2000]. Ризобии распознают растительные сигналы с помощью *nod*-белков [Spaink, 1995]. Эти рецепторные белки активизируют транскрипцию генов клубенькообразования, расположенных на плаزمиде [Downie, 2010]. Распознавание растительными рецепторами *Nod*-факторов инициирует формирование корневых клубеньков.

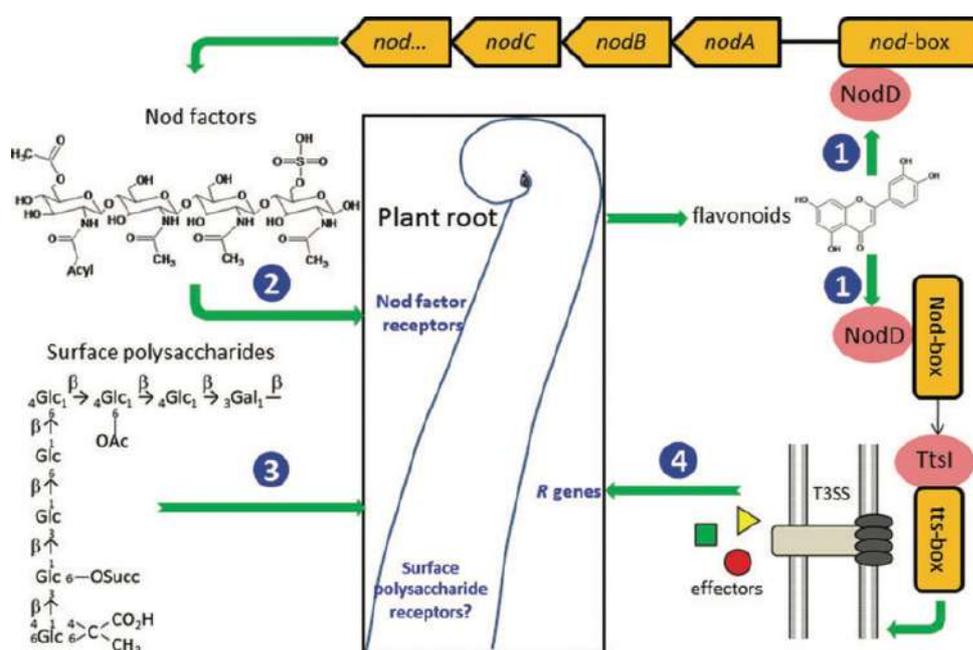


Рисунок 2. Молекулярные детерминанты специфичности растения-хозяина в процессе азотфиксирующего симбиоза. (Иллюстрация взята из статьи Wang et al., 2011).

Nod-факторы кодируются генами *nodABC*, в то время как другие *nod*, *noe* и *nol* гены азотфиксации кодируют молекулярные «декорации», определяющие специфичность растений-хозяев [Perret et al., 2000]. Данные процессы распознавания являются частью серии так называемых «ключевых и блокирующих» шагов. Растение-хозяин может использовать эти шаги для оценки потенциальных ризобиальных партнеров и для активного отбора ризобиальных генотипов [Gubry-Rangin et al., 2010; Sachs et al., 2010].

2.2. Плазмидный профиль клубеньковых бактерий. Симбиотические гены

Особенностью некоторых клубеньковых бактерий (*Rhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Agrobacterium* и *Shinella*) является их геномная организация в мульти репликаонах. Кроме того, фенотипические отличительные характеристики ризобий могут кодироваться во внехромосомных репликаонах (BP) [Ormeno-Orrillo et al., 2013]. У *Rhizobium* sp., *Ensifer* sp. и *Agrobacterium* sp. почти половина генома может быть представлена на BP, некоторые из которых играют роль в скорости роста и выживании ризобий.

Были выявлены два типа BP: плазмиды и хромиды [Harrison et al., 2010]. BP, которые несут "жизненно-важные" гены с консервативными генными последовательностями и имеют с хромосомой сходный GC-состав и использование кодонов, получили название хромидов.

К пулу генов, ответственных за азотфиксирующий симбиоз, у большинства ризобий относят *nod*-гены (гены вирулентности), контролирующие образование клубеньков на корнях бобовых растений, *nif*-гены, контролирующие синтез и регуляцию активности фермента нитрогеназы, и *fix*-гены, вовлеченные в работу нитрогеназного комплекса.

У группы быстрорастущих ризобий, таких как *Rhizobium* и *Ensifer* (*Sinorhizobium*), симбиотические гены (*nod*, *nif* и *fix*) обычно расположены на одной из крупных плазмид (pSymb). Другие крупные ризобиальные плазмиды несут гены, необходимые для бактериальной приспособляемости и конкурентоспособности в ризосфере, например, гены, кодирующие продуцирование бактериоцина, липополисахаридов, экзополисахаридов, использование различных источников углерода и синтез специфических витаминов [Ding and Hynes., 2009]. Хромосомная локализация симбиотических генов характерна для некоторых видов бактерий родов *Bradyrhizobium* sp. и *Mesorhizobium* sp. (*B. japonicum*, *M. loti*). Существуют также ризобии (*Rhizobium etli*), у которых большинство симбиотических генов расположено на хромосоме, а некоторые на плазмиде [Карасев с соавт., 2017].

Хотя было показано, что конъюгация плазмид непосредственно не повышает конкурентоспособность бактерий, она является одним из наиболее важных способов получения бактериями генетической информации и адаптации к изменяющимся условиям

окружающей среды. Ранее были выполнены работы, свидетельствующие о переносе ризобиальной плазмиды как в лабораторных условиях [Sepúlveda et al., 2008], так и в природных средах [Gomes-Barcellos et al., 2007].

В ранее проведенных работах было показано, что *nif*-гены и большинство *fix*-генов приобретены медленно растущими ризобиями (*Bradyrhizobium*) от свободноживущих предков (*Rhodopseudomonas*) с помощью вертикального наследования. А *nod*-гены получены от грамположительных бактерий или грибов посредством горизонтального переноса генов (ГПГ) [Provorov and Andronov., 2016].

M.Andrews и M.E. Andrews предположили, что горизонтальный перенос симбиотических генов на уровне родов ризобий является важным механизмом, позволяющим бобовым образовывать симбиозы с ризобиями, адаптированными к конкретным почвам. ГПГ также сохраняет специфичность между видами бобовых растений и ризобиальными видами, несущими специфичные гены симбиоза. В конкретных местообитаниях могут развиваться штамм-специфичные бобово-ризобиальные симбиозы [Andrews and Andrews, 2017].

3. Таксономия и описание клубеньковых бактерий

Бактерии, способные вступать в азотфиксирующий симбиоз с бобовыми растениями, принадлежат к различным группам α - и β -протеобактерий. Исходная классификация ризобий была основана на тестах перекрестной инокуляции между ризобиями и группами их растений-хозяев. Виды были также разделены на две группы: быстрорастущие штаммы и медленно растущие штаммы, исходя из времени их генерации и скорости роста на питательных средах. Однако результаты были непоследовательными как по диапазону растений-хозяев, так и по скорости роста, что поставило под сомнение обоснованность таких классификаций. Так, при использовании таких методов, как серология, РНК/ДНК или ДНК/ДНК гибридизация, анализ плазмид и т.д. стало возможным проводить таксономические исследования, которые полагались на фенотипичный и биохимический анализ.

За последние 25 лет были проведены обширные исследования разнообразия ризобий, в результате чего были официально описаны многие новые виды и роды. С точки зрения таксономии, ризобии представлены разными классами группы протеобактерий, и поэтому термин "ризобия" не представляет один таксон, а относится к полифилетической совокупности бактериальных линий, имеющих сходные функции [de Lajudie and Young., 2016]. Большинство известных ризобий принадлежат к различным родам α -протеобактерий следующих семейств: Rhizobiaceae (*Rhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Allorhizobium*, *Pararhizobium*, *Neorhizobium*, *Shinella*), Phyllobacteriaceae (*Mesorhizobium*, *Aminobacter*, *Phyllobacterium*), Brucellaceae (*Ochrobactrum*), Methylobacteriaceae (*Methylobacterium*, *Microvirga*), Bradyrhizobiaceae (*Bradyrhizobium*), Xanthobacteraceae (*Azorhizobium*) и Hyphomicrobiaceae (*Devosia*); но некоторые принадлежат к родам β -протеобактерий семейства Burkholderiaceae (*Paraburkholderia*, *Cupriavidus*, *Trinickia*). Для того чтобы отнести клубеньковый изолят к ризобиям, необходимо представить доказательства его способности образовывать клубеньки на корнях бобовых растений, поскольку в клубеньках могут присутствовать не только клубеньковые бактерии [Martínez-Hidalgo and Hirsch, 2017]. Гены симбиоза (*sym*), которые позволяют ризобиальным штаммам образовывать азотфиксирующие клубеньки на корнях бобовых растений, могут быть получены или утрачены бактерией, поскольку они часто расположены на мобильных плазмидах [Andrews et al., 2018].

Подкомитет, первоначально созданный Международным комитетом по систематике прокариот (ICSP) для обзора таксономии *Rhizobium* и *Agrobacterium*, расширил сферу своей деятельности, чтобы охватить функциональные и полифилетические группы

представителей этих бактерий. Поскольку определяющие признаки ризобий и агробактерий кодируются генами, которые могут быть получены или утеряны, и поэтому не являются непосредственно полезными для определения видов и родов, подкомитет также охватывает виды и штаммы, которые относятся к соответствующим родам, но не имеют (в настоящее время) симбиотических или патогенных фенотипов.

В период с 1991 г. по 2018 г. были разработаны алгоритмы описания новых видов ризобий и проведено секвенирование наборов хромосомных генов для многих видов. Это привело к созданию важной базы данных, которая постепенно служила основой для идентификации новых ризобальных видов и изолятов. На практике авторы дополнили оригинальную полифазную таксономию последовательностями нескольких однокопийных «house-keeping»-генов, разбросанных в геноме (MLSA – мультилокусное секвенирование). Эти гены обеспечивают более высокое филогенетическое разрешение, чем ген 16S рРНК, который все еще полезен для начальной приблизительной идентификации [Chun and Rainey., 2014]. Использование нескольких генов минимизирует влияние возможного горизонтального переноса генов. Было показано, что почти все гены, даже 16S рРНК, горизонтально переносятся во время эволюции [Eardly et al., 2005; Young and Haukka, 1996; Tian et al., 2012], следовательно, филогенез одного гена может не отражать филогенез вида. В последние годы многие новые описания ризобальных видов включали информацию о полногеномном секвенировании, предоставляя данные, предоставляя высокоинформативные, точные и воспроизводимые данные. de Lajudie с соавторами утверждали, что современная классификация ризобий, основанная на полифазных исследованиях (включая ДНК-ДНК гибридизацию, филогению гена 16S рРНК и фенотипические особенности), по существу подтверждается MLSA и геномными данными [de Lajudie et al., 2019]. Поэтому переход к описанию новых видов на основе генома не потребует серьезного переосмысления текущей таксономии, но сделает будущую таксономическую работу проще и надежнее.

Согласно последним данным по таксономии ризобий [de Lajudie and Young., 2017; de Lajudie and Young., 2018] на данный момент введены и описаны следующие изменения систематики: добавлены 2 новых рода (*Neorhizobium*, *Pararhizobium*) и 86 новых видов (*Rhizobium* spp. (37), *Bradyrhizobium* spp. (30), *Mesorhizobium* spp. (13), *Ensifer* spp. (4), *Pararhizobium* spp. (2)) (табл. 1).

Таблица 1. Новые таксоны в систематике клубеньковых бактерий.¹

Вид и типовой штамм	Растение-хозяин	Ссылка
Rhizobium		
<i>Rhizobium acidisoli</i> FH13 ^T =CCBAU 101094 ^T =HAMBI 3626 ^T =LMG 28672 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Roman-Ponce et al., 2016
<i>Rhizobium anhuiense</i> CCBAU 23252 ^T =CGMCC 1.12621 ^T =LMG 27729 ^T	<i>Vicia faba</i>	Zhang et al., 2015
<i>Rhizobium azibense</i> 23C2 ^T =CCBAU 101087 ^T =HAMBI 3541 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Mnasri et al., 2014
<i>Rhizobium ecuadorensense</i> CNPSo 671T =UMR 1450 ^T =PIMAMPIRS I 5 ^T =LMG 27578 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Ribeiro et al., 2015
“ <i>Rhizobium hidalgonense</i> ” FH14T =HAMBI 3636 ^T =LMG 29288 ^T (nod-)*	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Yan et al., 2017
<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 ^T =LMG 27434T ^T =CECT 8280 ^T	<i>Vicia faba</i>	Saïdi et al., 2014
<i>Rhizobium paranaense</i> PRF 35 ^T =CNPSo 120 ^T =LMG 27577 ^T =IPR-Pv1249 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Dall’Agnol et al., 2014
<i>Rhizobium aethiopicum</i> HBR26 ^T (=HAMBI 3550 ^T =LMG 29711 ^T)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Aserse et al., 2017
<i>Rhizobium vallis</i> CCBAU 65647 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Wang 2et al., 2011
<i>Rhizobium leucaenae</i> CFN 299 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Ribeiro et al., 2012
<i>Rhizobium mesoamericanum</i> CCGE 501 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	López-López et al., 2012
<i>Rhizobium freirei</i> PRF 81 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Dall’Agnol et al., 2013
Bradyrhizobium		
<i>Bradyrhizobium ottawaense</i> OO99 ^T =LMG 26739 ^T =HAMBI 3284 ^T	<i>Glycine max</i>	Yu et al., 2014
<i>Bradyrhizobium huanghuaihaiense</i> HAMBI 3180 ^T	<i>Glycine max</i>	Zhang et al., 2012
<i>Bradyrhizobium daqingense</i> CCBAU 15774 ^T	<i>Glycine max</i>	Wang et al., 2013
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110 ^T	<i>Glycine max</i>	Delamuta et al., 2013
Pararhizobium		
<i>Pararhizobium giardinii</i> comb. nov. H152 ^T =HAMBI 2323 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Mousavi et al., 2015
Ensifer		
<i>Ensifer glycinis</i> CCBAU 23380 ^T =LMG 29231 ^T =HAMBI 3645 ^T	<i>Astragalus mongholicus</i> , <i>Glycine max</i>	Yan et al., 2016
<i>Ensifer sojae</i> CCBAU 05684 ^T	<i>Glycine max</i>	Li et al., 2011

*Примечание: Родовидовые названия, указанные в кавычках, были предложены в опубликованных материалах исследований, но еще не подтверждены публикацией в Международном журнале по систематике и эволюционной микробиологии.

¹ Представлены таксоны клубеньковых бактерий, исследование которых проводилось в рамках настоящей работы, а именно - микросимбионты *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Vicia faba*, *Glycine max*.

Для надлежащего описания нового рода или вида ризобии, по мнению Подкомитета, необходимы следующие минимальные стандарты:

- Последовательность генома должна быть доступна для типового штамма. Геном может быть не полностью собран, но минимальные сведения должны быть представлены и соответствовать предложенным минимальным стандартам использования данных генома для таксономии прокариот [Chun et al., 2018].
- Должны быть представлены доказательства отличия вводимого вида от других видов, которые основаны на оценке сходства геномных последовательностей типовых штаммов.

Рекомендуется также включать следующую дополнительную полезную информацию:

- Внутривидовые отличия должны быть описаны на основе нескольких явно различных штаммов.
- Фенотипические данные, в частности информация, необходимая для культивирования организмов и понимания их экологии, должны быть предоставлены для выборки штаммов, представляющих вариабельность вида.
- Предоставление информации о способности к взаимодействию с растениями и о соответствующих генных последовательностях: фенотип клубенькообразования (нодулирующая способность, эффективность, спектр растений-хозяев) и последовательности *nod/nif* генов.

Описанная выше информация дополняет действующие правила общей бактериальной таксономии, изложенные в Международном кодексе номенклатур прокариот [Parker et al., 2019], которые включают следующие обязательные требования:

- Новые названия должны соответствовать Международному кодексу номенклатуры прокариот.
- Описания должны быть правильно опубликованы либо непосредственно в Международном журнале по систематике и эволюционной микробиологии ([International journal of systematic and evolutionary microbiology](#)), либо в других изданиях из утвержденного списка, предоставляемого данным журналом.
- Типовые штаммы должны быть депонированы в двух признанных микробиологических коллекциях в двух разных странах с возможностью доступа к бактериальной культуре.

4. Биоразнообразие симбиотических бактерий порядка Rhizobiales и детектирующие его методы

На настоящий момент к порядку Rhizobiales относят следующие семейства и роды:

- Семейство Rhizobiaceae (роды *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Allorhizobium*, *Carbophilus*, *Chelatobacter*, *Ensifer*, *Sinorhizobium*)
- Семейство Bartonellaceae (род *Bartonella*)
- Семейство Brucellaceae (роды *Brucella*, *Mycoplana*, *Ochrobastrum*)
- Семейство Phyllobacteriaceae (роды *Phyllobacterium*, *Aminobacter*, *Aquamicrobium*, *Defluviobacter*, *Liberibacter*, *Mesorhizobium*, *Pseudominobacter*)
- Семейство Methylocystaceae (роды *Methylocystis*, *Albibacter*, *Methylosinus*)
- Семейство Beijerinckiaceae (роды *Beijerinckia*, *Chelatococcus*, *Methylocella*)
- Семейство Bradyrhizobiaceae (роды *Bradyrhizobium*, *Afipia*, *Agromonas*, *Blastobacter*, *Bosea*, *Nitrobacter*, *Oligotropha*, *Rhodoblastus*, *Rhodopseudomonas*)
- Семейство Hyphomicrobiaceae (роды *Hyphomicrobium*, *Ancalomicrobium*, *Ancylobacter*, *Angulomicrobium*, *Aquabacter*, *Azorhizobium*, *Blastochloris*, *Devosia*, *Dichotomicrobium*, *Filomicrobium*, *Gemmiger*, *Labrys*, *Methylorhabdus*, *Pedomicrobium*, *Prosthecomicrobium*, *Rhodomicrobium*, *Rhodoplanes*, *Seliberia*, *Starkeya*, *Xanthobacter*)
- Семейство Methylobacteriaceae (род *Methylobacterium*)
- Семейство Rhodobiaceae (род *Rhodobium*)

В рамках настоящего исследования было изучено биоразнообразие клубеньковых бактерий, относящихся к семействам Rhizobiaceae и Bradyrhizobiaceae.

Описание и введение новых таксонов в ризобияльной систематике должны быть подкреплены доказательствами отличия данных бактерий от представителей уже существующих таксонов на разных уровнях организации бактериальной клетки. До относительно недавнего времени главным образом использовался полифазный анализ с применением молекулярно-маркерной филогении, результатов ДНК-ДНК гибридизации и описания различных отличительных фенотипических признаков.

Для более точной оценки филогенетических отношений видов в пределах рода или рода в пределах семейства в настоящее время широко используется мультилокусное секвенирование – MLSA. В исследованиях MLSA частичные последовательности генов, кодирующих белки с консервативными функциями, используются для построения филогенетических деревьев. Несмотря на то, что MLSA стал общепринятым и широко используемым методом в таксономии прокариот и идентификации, до настоящего времени не было разработано единых общепринятых рекомендаций для таксономического

применения отдельных схем MLSA. Способы осуществления MLSA могут сильно варьироваться в зависимости от выбора генов, праймерных систем, их количества и метода вычисления, используемого при сравнении полученных последовательностей [Glaeser and Kämpfer, 2015]. Что делает создаваемую базу генетических данных весьма разрозненной и не позволяющей системно подходить к дифференциации различных бактериальных таксонов.

Развитие геномных технологий позволило добиться значительного прогресса в таксономии ризобий. На настоящий момент опубликовано несколько обзоров по таксономии и биоразнообразию ризобий [Zakhia F. et al., 2001; Sawada H. et al., 2003; Willems A., 2006], но ни один из них не был специально ориентирован на геномику.

В течение многих лет идентификация и дифференциация прокариотических видов велась по результатам ДНК-ДНК гибридизации. Однако существуют альтернативы для оценки связанности ДНК, такие, как средняя идентичность нуклеотидов (ANI) полного генома [Konstantinidis and Tiedje., 2005] и *in silico* проведенная ДНК-ДНК гибридизация [Auch et al., 2010].

Новые количественные геномные анализы начинают использоваться в бактериальной таксономии. Были опубликованы описания видов, где ANI и/или *in silico* ДНК-ДНК гибридизация, были использованы для поддержки и дополнения результатов практически проведенной ДНК-ДНК гибридизация [Delamuta et al., 2016]. Отсутствие последовательностей генома для большинства типовых штаммов ризобий является ограничивающим фактором для использования этих новых подходов.

Филогеномный анализ показал, что бактерии семейства Rhizobiaceae образуют две основные суперклады, которые соответствуют группам *Rhizobium/Agrobacterium* и *Shinella/Ensifer* (рис. 3). В группе *Rhizobium/Agrobacterium* были выделены четыре клады, которые соответствовали различным родам. Группа *Shinella/Ensifer* включала не только роды *Shinella* и *Ensifer*, но и отдельную кладу, содержащую типовой штамм *Rhizobium giardinii*. Представленный филогеномный анализ дал основание для восстановления рода *Allorhizobium*, как достоверно отличимого от остальных родов семейства Rhizobiaceae, и создал предпосылки для выделения *R. giardinii* в новый род, что и было сделано впоследствии [Mousavi et al., 2015]. Геномика позволяет получать данные для определения границ бактериальных видов исходя из оценок средней идентичности нуклеотидов (ANI) и *in silico* ДНК-ДНК гибридизации (DDH). Эталонные значения ANI становятся золотым стандартом в идентификации и дифференциации ризобий.

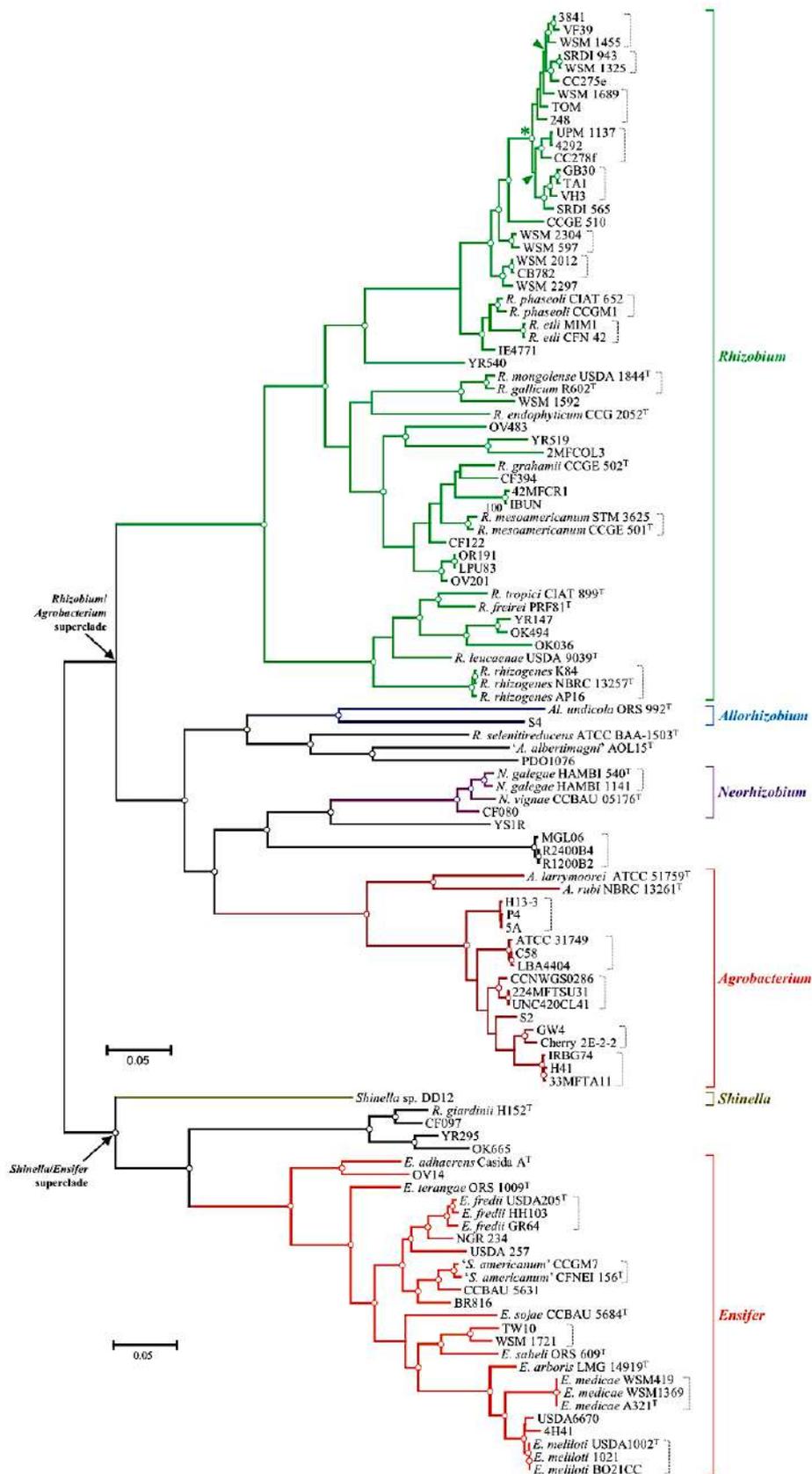


Рисунок 3. Филогеномный анализ, показывающий эволюционные связи между 113 секвенированными штаммами семейства Rhizobiaceae. (Иллюстрация взята из статьи Ormeno-Orrillo et al., 2013).

Для оценки видового разнообразия бактерий рода *Bradyrhizobium* также применяются методы ДНК-ДНК гибридизации и мультилокусное секвенирование (MLSA). Количество введенных новых видов брадиризовий быстро растет [Parté, 2014; de Lajudie and Young, 2017]. Различные виды *Bradyrhizobium* являются основными клубеньковыми микросимбионтами таких важных бобовых культур, как соя [Delamuta et al., 2013], фасоль Лима [Durán et al., 2014] и арахис [Steenkamp et al., 2008], и были выделены из клубеньков на корнях бобовых растений тропического [Ramírez-Bahena et al., 2009; López-López et al., 2013; Delamuta et al., 2015] и умеренного климата [Vinuesa et al., 2005a; Stepkowski et al., 2007].

Было выявлено большое разнообразие брадиризовий на основе последовательностей некоторых генов, используемых в качестве молекулярных маркеров. К роду *Bradyrhizobium* относятся штаммы, способные фиксировать азот в качестве эндофитов некоторых растений [Piromye et al., 2015], например рис, кукуруза и сосна [Chaintreuil et al., 2000; Tan et al., 2001].

В настоящее время в открытом доступе предоставлены геномы 187 брадиризовиальных штаммов. Бактерии рода *Bradyrhizobium* имеют характерные большие геномы с небольшим количеством плазмид и без симбиотических плазмид за одним исключением [Okazaki et al., 2015]. В хромосомах *Bradyrhizobium* имеются острова симбиоза, которые несут в себе *nod*-гены и *nif*-гены, которые отвечают за образование клубеньков и фиксацию азота, соответственно. Маркеры симбиоза, которые обычно используются для филогенетического анализа симбиоза, представляют собой гены *nifH* и *nod*. Что касается генов клубенькообразования, то существует большое разнообразие генов *nodA* или *nodC* [Stepkowski et al., 2007; Martínez-Romero et al., 2010] и филогенез этих генов отражает вертикальную, а также горизонтальную передачу этих генов между брадиризовиями [Moulin et al., 2004; Menna and Hungria, 2011].

Новые методики для идентификации и дифференциации видов основаны на анализе генома и средней нуклеотидной идентичности (ANI) [Richter and Rossello-Mora, 2009] и филогеномике [Wu and Scott, 2012]. Филогеномное исследование штаммов *Bradyrhizobium* показало, что наличие и тип флагеллума подтверждаются филогенетически [Garrido-Sanz et al., 2019].

5. Способы повышения эффективности бобово-ризобияльного симбиоза

5.1. Бактериальные препараты на основе почвенных микроорганизмов для агробιοтехнологии

Ризобии различных таксонов очень широко представлены в почвах как результат естественного распространения и выращивания бобовых растений. Несмотря на это, все еще существуют почвы, в которых штаммы ризобий, специфичные для бобовых культур, отсутствуют или присутствуют лишь в небольших концентрациях [Amarger, 2001]. В тех случаях, когда определенное бобовое растение уже давно присутствует в сельскохозяйственной системе или рассматривается в качестве традиционной культуры, вполне вероятно, что данные почвы будут иметь в составе микробиома достаточное число местных бактерий для клубенькообразования. Тем не менее, предпосевная инокуляция микробными препаратами на основе клубеньковых бактерий является общепринятой сельскохозяйственной практикой. Введение ризобияльных штаммов может быть желательным в тех случаях, когда в почвах содержатся популяции ризобий, которые симбиотически неактивны в отношении конкретного бобового [Deaker et al., 2004], или когда становятся доступными штаммы с более высокой эффективностью [Bosworth et al., 1994].

Инокуляция бобовых является установившейся сельскохозяйственной практикой, которая уже более века используется для введения ризобий в почву [Stephens and Rask, 2000; Deaker et al., 2004]. Во многих странах инокуляты производятся на коммерческой основе. Их качество зависит как от количества содержащихся в них ризобий, так и от их эффективности по фиксации азота с растением-хозяином. Симбиотическая эффективность является одним из важнейших факторов при выборе штамма-инокулята. Другими характеристиками, подлежащими рассмотрению, являются генетическая стабильность, способность выживать в конечном биопрепарате, сохраняться в почве и конкурировать в формировании клубеньков с местными почвенными популяциями клубеньковых бактерий [Graham and Vance, 2000]. В Бразилии Thies с коллегами было обнаружено, что повторная инокуляция соевых бобов гарантирует повышенное образование клубеньков инокулированными штаммами, повышенную фиксацию азота и урожайность сельскохозяйственных культур.

Микробные биопрепараты (инокуляты) производят в порошкообразной, гранулированной или жидкой форме [Date, 2000; Deaker et al., 2004]. Они могут наноситься непосредственно на семена, что является традиционным и наиболее часто используемым способом инокуляции, иммобилизованы на минеральных гранулах или применяться непосредственно в почву, в посевное место [Hynes et al., 1995]. Качество микробного

биопрепарата оценивается по числу жизнеспособных клеток клубеньковых бактерий. Титр инокулята – величина не постоянная, и в настоящее время в странах, где контроль качества не практикуется на систематической основе, производят микробные биопрепараты низкого качества с нестабильным титром в процессе хранения. Однако высококачественные биопрепараты получают в порошкообразной или жидкой форме со сроком хранения при комнатной температуре в течение года и стабильным титром до 10^6 КОЕ ризобий. Высококачественные инокуляты способны обеспечивать приблизительно от 2×10^{11} до 4×10^{11} КОЕ ризобий на гектар [Catroux and Amarger, 1992].

Инокуляция семян непосредственно перед посевом является наиболее популярным из используемых методов, однако существует большой спрос на дражированные семена (на семена до продажи наносят слой защитной питательной оболочки). Эта технология покрытия семян подверглась сомнениям после первых испытаний, которые выявили плохую выживаемость клеток ризобий [Deaker et al., 2004]. Другие способы нанесения инокулята, которые включают запыление семян культурой торфа, приводят к разрушению большей части инокулята по мере высыхания влажного торфа. Однако, добавление адгезивной основы к инокуляту приводит к удержанию большего количества торфа в оболочке, предотвращает отслаивание материала и уменьшает повреждение клеток ризобий.

5.2. Микробные биопрепараты на основе консорциумов полезных почвенных микроорганизмов с микроводорослями

В условиях интенсификации сельскохозяйственного производства резко возрастает роль биологических факторов повышения почвенного плодородия и микробиологической активности, урожайности культур, ускорения сроков вегетационного периода и качества продукции растениеводства.

Перспективным является метод альгологизации, который заключается в орошении почв суспензией живых культур микроводорослей. Некоторые группы высокопродуктивных микроводорослей способны заменить сложившуюся традиционную систему использования больших доз минеральных удобрений, пестицидов, гербицидов и т.д. Биомасса водорослей способствует накоплению азота в почве, обогащает ее фосфором, калием, йодом, а также выделяет биологически активные вещества, которые стимулируют жизнедеятельность полезных почвенных микроорганизмов, положительно влияют на рост корней.

Большой интерес в этой сфере представляют зеленые микроводоросли *Chlorella*, *Scenedesmus* и цианобактерии *Nostoc*, *Anabaena*. Проведенные ранее исследования

отмечают высокую эффективность использования хлореллы в сельском хозяйстве, ее положительное влияние на всхожесть семян, повышение урожайности и, в конечном итоге, ее экономическую эффективность. Хлореллу весьма успешно применяют в сельскохозяйственном производстве в качестве пищевых добавок к рациону различных животных, для улучшения плодородия почв, увеличения всхожести семян при их замачивании в суспензии хлореллы или в культуральной среде, при силосовании и т. д. Доказано, что микроводоросли и цианобактерии способны увеличивать запасы питательных веществ, необходимых высшим растениям.

Цианобактерии и микроводоросли, наряду с известными средствами защиты растений, могут служить основой для разработки новых средств и препаратов, а также могут служить биологическими индикаторами состояния окружающей среды и ее обитателей, особенно в искусственных экосистемах.

В работах Трефиловой Л.В. была доказана перспективность совместного применения цианобактериальных или водорослевых культур с полезными почвенными бактериями в качестве микробного препарата для предпосевной инокуляции семян [Трефилова, 2008]. Также была выявлена фунгицидная активность цианобактерий, ростостимулирующий эффект и способность некоторых видов к симбиотрофной азотфиксации.

В ходе практического применения и научных исследований было выявлено, что микроводоросли, особенно цианобактерии, могут считаться одним из основных биологических агентов для борьбы с патогенными грибами и болезнями почв у растений поскольку они продуцируют биологически активные соединения, обладающие противогрибковой, антибиотической, токсической активностью и в отношении нематод.

Таким образом, в настоящее время научные исследования по созданию биопрепаратов – средств защиты растений основаны на следующих действиях микроводорослей:

1. Биоинсектицидные действия. В нескольких исследованиях было обнаружено, что морские водоросли содержат сложные вторичные метаболиты, которые играют важную роль в защите хозяина от хищников и паразитов. Механизм действия остается не до конца изученным.
2. Антибактериальные действия. Водоросли являются богатым источником антиоксидантных полифенолов с бактерицидными свойствами.
3. Противогрибковые действия. В настоящее время, в свете опасений по поводу использования химических фунгицидов на садовых культурах, необходимо оценить альтернативные стратегии, в которых используются нефунгицидные продукты, такие как препараты из микроводорослей.

4. Противовирусные действия. Вирусные заболевания растений являются вторыми по величине болезнями растений и в основном несут огромные потери в сельскохозяйственной отрасли. Хотя химиотерапевтическое лечение является прямым и эффективным методом борьбы с этими вирусами, но оно вызывает ряд побочных эффектов, включая улучшение устойчивости к этим лекарственным средствам со временем и накоплением избыточных остатков пестицидов в почве. Большой прогресс был достигнут в открытии новых биогенных противовирусных веществ [Seham et al., 2018].

В рамках данной работы был проведен анализ способов повышения эффективности бобово-ризобиального симбиоза с помощью консорциумов полезных почвенных микроорганизмов. Консорциумы представляют собой штаммы специфичных клубеньковых бактерий, стабилизированных культурами цианобактерий или водорослей. Подобный состав микробного инокулята способствует более полному раскрытию природного потенциала сорта, увеличению и поддержанию плодородия почв, увеличению количества и качества урожая. Выявленная ранее сорт-штаммовая специфичность бобово-ризобиального симбиоза позволяет отбирать генотипы клубеньковых бактерий, тем самым повышая эффективность азотфиксирующего симбиоза [Волобуева с соавт., 2016].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Объекты исследования

1.1. Клубеньковые бактерии

В качестве объектов исследования в работе были использованы 96 штаммов (приложение 1) клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* из Крымской коллекции микроорганизмов ФГБУН «НИИ сельского хозяйства Крыма» (Симферополь, Республика Крым) (<http://www.ckp-rf.ru/usu/507484/>). Исследуемая выборка представлена микросимбионтами различных бобовых культур и географического происхождения: горох посевной *Pisum sativum* L. (22 шт.), бобы *Vicia faba* L. (13 шт.), фасоль обыкновенная *Phaseolus vulgaris* L. (43 шт.) и соя *Glycine max* L. (18 шт.).

Также в работе были использованы 11 типовых штаммов клубеньковых бактерий из различных отечественных и зарубежных коллекций (ВКПМ, DSMZ, BCCM/LMG).

1.2. Сельскохозяйственные бобовые культуры

В качестве макросимбионта в данной работе были исследованы основные возделываемые сельскохозяйственные бобовые культуры, а именно различные сорта фасоли, гороха и сои отечественной и иностранной селекции, а также по одному сорту бобов, чечевицы и чины (табл. II.2).

Таблица II.1. Описание зернобобовых культур, исследуемых в работе.

Зернобобовая культура	Сорт/сортообразец	Оригинатор
Фасоль (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Гелиада	ВНИИЗБК (Россия)
	Рубин	ВНИИЗБК (Россия)
	Стрела	ВНИИЗБК (Россия)
	Шоколадница	ВНИИЗБК (Россия)
	Сортообразец 08-543	ВНИИЗБК (Россия)
	Сортообразец 09-147	ВНИИЗБК (Россия)
	Сортообразец 05-82	ВНИИЗБК (Россия)
	Сортообразец 09-180	ВНИИЗБК (Россия)
Горох (<i>Pisum sativum</i> L.)	Девиз	ОАО НПФ «БЕЛСЕЛЕКТ» (Россия)
	Софья	ВНИИЗБК (Россия)
	Сахарный	Группа компаний «Гавриш» (Россия)
	Фараон	ВНИИЗБК (Россия)
	Жегалова 112	Группа компаний «Гавриш» (Россия)
	Амброзия	Группа компаний «Гавриш» (Россия)
	Подружка	Группа компаний «Гавриш» (Россия)
	Спартак	ВНИИЗБК (Россия)
Детский	Группа компаний «Гавриш» (Россия)	
Бобы (<i>Vicia faba</i> L.)	Билун	Прикарпатская государственная сельскохозяйственная опытная станция Института сельского

		хозяйства Карпатского региона НААН Украины
Чечевица (<i>Lens culinaris</i> L.)	Линза	Красноградская опытная станция Института зернового хозяйства НААН Украины
Чина (<i>Lathyrus sativus</i> L.)	Сподиванка	Институт сельского хозяйства степной зоны НААН Украины
Соя (<i>Glycine max</i> L.)	Зуша	ВНИИЗБК (Россия)
	Красивая меча	ВНИИЗБК (Россия)
	Магева	ВИМ (Россия)
	Semu-315	н/д (Германия)
	MON-23	н/д (США)

1.3. Клубенок-образующие единицы (КлОЕ)

При проведении полевых и лабораторных испытаний с целью выявления специфичности бобово-ризобиального симбиоза анализу подвергали клубеньки, образовавшиеся на корнях растений. Сбор проводили в фазу цветения, на 3-4 неделе после всходов (лабораторный опыт), на 5-6 неделе (полевой опыт). С нескольких растений каждого вида (в зависимости от схемы опыта) отбирали активные клубеньки для формирования усредненной выборки и трехкратно отмывали от почвы в стерильной воде. Штамму клубеньковой бакетрии, образовавшему клубенок, был присвоен термин клубенок-образующие единицы (КлОЕ). Для оценки генотипов КлОЕ, минуя стадию получения чистых культур, клубеньки растирали пестиком в 200 мкл MQ и затем выделяли тотальную ДНК с помощью фенол-хлороформного метода.

1.4. Штаммы микроводорослей и цианобактерий

Для анализа влияния микроводорослей и цианобактерий на функционал и стабильность монокомпонентного биопрепарата на основе эффективных ризобиальных штаммов использовали культуры альгологически чистых зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (коллекция кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова) и почвенной цианобактерии *Nostoc linckia* CCM 144 (ACSSI 271 – Альгологическая коллекция ИФХиБПП РАН – Algal Collection of Soil Science Institute).

2. Методы исследования

2.1. Культивирование микроорганизмов

Чистые культуры клубеньковых бактерий и цианобактерий хранили на минимальных средах при 3-4°C в холодильнике. Культуры микроорганизмов по мере необходимости обновляли путем посева и выращивания на жидких (в колбах Эрленмейера) или твердых агаризованных ПС (на чашках Петри).

Перед использованием исходные культуры (не менее 3 проб) контролировали на:

- отсутствие посторонней микрофлоры (микроскопия и высев на ГРМ (агар) или молоко с лакмусом);
- отсутствие вирулентного фага (высев на чашки Петри на газон с индикаторной культурой рабочего штамма);
- титр бактерий.

Исходную культуру ризобий пересевали на минимальную агаризованную среду ТУ следующего состава (г/л) (рН – 7,0-7,2): триптон – 10; дрожжевой экстракт – 1,0; CaCl₂ – 0,4; Агар – 15,0. Чашки Петри выдерживали в термостате при 28-30°C в течение 3 суток. Питательные среды готовили на водопроводной воде и стерилизовали при 1 атм в течение 30-40 мин.

2.2. Выделение ДНК

Выделение бактериальной ДНК проводили посредством фенол-хлороформной экстракции с последующим осаждением изопропанолом [Laguette et al., 1992]:

- Собирали 1,5 мл ночной культуры (или 2 микробиологической петли в случае поверхностных культур).

- ЦФ 13000 об/мин 5 мин.

- К осадку добавляли 400 мкл реакционной смеси:

1 М Tris·HCl (рН 8) – 10 мкл

0,5 М ЭДТА (рН 8) - 8 мкл

Лизоцим или протеиназа К – 20 мкл

РНКаза – 0,1 мг

H₂O – 362 мкл

- Добавляли SiO₂, перемешать 20 сек (дополнительная опция).
- Выдерживали пробирки 5-15 мин при комнатной температуре.
- Добавляли SDS до концентрации 1 % (40,4 мкл)
- Выдерживали при температуре -20°C 30 мин для снижения вязкости.

- Экстрагировали фенол-хлороформом (1:1 по объему) (происходит денатурация белков + очистка).
- ЦФ 10 мин при 13000 об/мин. Затем аккуратно отбирали в другую пробирку 400 мкл водной фазы (сверху), стараясь не захватывать полисахариды интерфазы.
- Экстрагировали хлороформом (1:1 по объему) – 400 мкл.
- ЦФ 5 мин при 13000 об/мин. Затем отбирали 350 мкл надосадочной жидкости в новую пробирку.
- Добавляли 1/10 объема 3М ацетата натрия ($C_2H_3O_2Na$) – 35 мкл.
- Добавляли 2 объема этанола (C_2H_5OH) или 1 объем изопропанола (C_3H_8O) (мгновенное оседание).

Примечание: предпочтительнее использовать изопропанол.

- ЦФ 13000 об/мин 10 мин. На этой стадии можно визуализировать ДНК.
- Тщательно удаляли надосадочную жидкость. Добавляли 200 мкл 70% этанола (промывка, растворяются соли, но не растворяется ДНК). ЦФ 13000 об/мин 2 мин. Подсушивали на столе в горизонтальном положении 15-20 мин.
- Растворили полученную ДНК в 50 мкл деионизированной воды (удельное сопротивление 18,2 МОм·см/с).
- Хранили при $-20^{\circ}C$.

Также были использованы наборы для выделения ДНК: Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification Kit и Invitrogen PureLink Genomic DNA Kit. Выделение ДНК осуществлялось согласно инструкциям производителей.

2.3. Генотипирование бактерий

Генотипирование и определение таксономического положения бактериальных штаммов проводили с использованием анализа мультилокусного секвенирования – MLSA (Multilocus sequence analysis, мультилокусный анализ белок-кодирующих генов). В рамках данного анализа - это ПЦР-амплификация генов «домашнего хозяйства», а именно 16S рНК, *gyrB* и *rpoB*, межгенных регионов 16S-23S рНК (ITS) и *hin*-региона, а также симбиотических генов – *nodD*, *nodC*, *nifH*, *nifD*-К. ПЦР анализ и последующее секвенирование нуклеотидных последовательностей проводили с использованием следующих праймеров (табл. II.2).

Таблица II.2. Праймеры, используемые в работе.

Маркер	Праймеры	Ссылка	Температурно-временной режим ПЦР
16S рНК	FD1 и RD1	Weisburg et al., 1991	первоначальная денатурация при $94^{\circ}C$ - 2 мин; последующие 35 цикла: $94^{\circ}C$ – 30 с, $59^{\circ}C$ - 30 с, $72^{\circ}C$ - 1 мин;

			окончательная элонгация - 5 мин при 72°C.
16S-23S pPHK (ITS)	FGPS1490-72 ITS_R	Normand et al., 1992 Зотов с соавт. 2012	первоначальная денатурация при 94°C - 5 мин; последующие 35 цикла: 94°C - 1 мин, 58°C - 30 с, 72°C - 1 мин; окончательная элонгация - 5 мин при 72°C
<i>rpoB</i>	<i>rpoB_F</i> <i>rpoB_R</i>	Пунина с соавт, 2013 Martens et al., 2008	первоначальная денатурация при 94°C - 5 мин; последующие 4 цикла: 94°C - 2 мин, 58°C - 2 мин, 72°C - 1 мин; последующие 31 цикл: 94°C - 30 с, 58°C - 1 мин, 72°C - 1 мин; окончательная элонгация - 5 мин при 72°C
<i>hin</i> - регион	Pr. rhizF и Pr. rhizR (специфическ ие для рода <i>Rhizobium</i>)	Патент № 2486251, 2011	первоначальная денатурация при 94°C - 2 мин; последующие 35 циклов: 94°C - 1 мин, 56°C - 1 мин, 72°C - 1 мин; окончательная элонгация - 5 мин при 72°C
<i>nodD</i>	NBA12 и NBF12`	Laguerre et al., 1996	первоначальная денатурация при 94°C - 3 мин; последующие 35 циклов: 94°C - 1 мин, 55°C - 1 мин, 72°C - 2 мин; окончательная элонгация - 3 мин при 72°C
<i>nodC</i>	<i>nodCI`</i> и <i>nodCF`</i>	Laguerre et al., 2001	
<i>nifH</i>	<i>nifHF</i> и <i>nifHI</i>	Laguerre et al., 2001	первоначальная денатурация при 94°C - 3 мин; последующие 35 циклов: 94°C - 1 мин, 57°C - 1 мин, 72°C - 2 мин; окончательная элонгация - 3 мин при 72°C.

Состав ПЦР-смеси соответствовал протоколу производителя (кат. № РК113L, ЗАО «Евроген», Россия). Разделение амплифицированных фрагментов проводили при помощи электрофореза в 1.5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия и последующей визуализацией на трансиллюминаторе. Единичные целевые фрагменты маркерных генов (ПЦР-продукты) подвергали ферментативной очистке (к 10 мкл ПЦР-продукта добавить 0,025 мкл нуклеазы *EcoI* (20ед/мкл), 0,05 мкл *SAP* (1 ед/мкл), 0,35 мкл буфера *SAP* и 9,575 мкл *MQ*; температурно-временной режим - 37°C (40 мин.), 80°C (15 мин.)), а затем определяли нуклеотидные последовательности методом прямого секвенирования по методу Сэнгера [Sanger et al., 1977] на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3130 xl (“Applied Biosystems”, США) с применением набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (ЗАО «Евроген», Россия).

Анализ длин рестрикционных фрагментов (RFLP). Продукты амплификации исследуемых генов (*nodD*, *rpoB*) обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *MspI* согласно инструкциям производителя («Fermentas», США). Продукты рестрикции ДНК анализировали путем электрофоретического разделения в 3.0% агарозном геле с добавлением бромистого этидия и последующей визуализацией на трансиллюминаторе.

2.4. Фингерпринтинг saAFLP с использованием эндонуклеаз рестрикции

Комбинацией ПЦР и ДНК-рестрикции является метод AFLP - Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis [Vos et al, 1995]. В данной работе был использован модифицированный метод saAFLP. Суть метода saAFLP заключается в применении одного фермента и единичного адаптера с последующим анализом при помощи агарозного геле-электрофореза [Gibson et al., 1998; Valsangiacomo et al., 1995]. В результате становится возможным получить высоко воспроизводимые фингерпринты из 5-20 генетических признаков, отражающих архитектуру генома в целом и позволяющих проводить поиск специфичных маркеров для последующей идентификации и диагностики бактерий [Зотов, 2013].

Выделенная из образца ДНК расщепляется рестриктазами, далее проводится лигирование с адаптерами и последующая амплификация с праймерами, специфичными для адаптеров. Длины полученных фрагментов определяют с помощью капиллярного электрофореза или в ПААГ. AFLP применим к ДНК любого происхождения и сложности. Этот метод объединяет универсальность применения с высоким уровнем разрешающей способности и воспроизводимостью [Janssen et al., 1996]. AFLP нашел широкое применение в генетическом картировании растений и животных, медицинской диагностике, филогенетических исследованиях и типировании микроорганизмов.

Рестрикционный анализ проводили одновременно с лигированием в 10 мкл смеси, содержащей 80 нг образца ДНК, 1х лигазный буфер, 10 пкМ одноцепочечного адаптера (Ad.CTAG1: 5`-ctagCTGGAATCGATTCCAG-3`), 5 ед. T4 ДНК лигазы и 1 ед. рестриктазы (*XmaI*, *XbaI*, *AsuNI*). Полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 2 часов, после чего доводили реакционный объем до 100 мкл. ПЦР в 25 мкл смеси, содержащей: 1х буфер для ПЦР, 2,8 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTP, в качестве ДНК-матрицы - 2 мкл рестрикционно-лигазной смеси, 0,4 мкМ праймера, комплементарного адаптеру, и 1 ед. Taq ДНК-полимеразы. Для ПЦР амплификации использовали следующий температурно-временной профиль: первоначальная денатурация при 94°C - 2 мин; последующие 35 циклов: 94°C - 30 с, 40°C - 30 с, 72°C - 3 мин; окончательная элонгация - 5 мин при 72°C.

2.5. Методы лабораторного и полевого вегетационных опытов

Лабораторные опыты проводили в 0,5 литровых пластиковых стаканах в климатических камерах при 12-часовом светодиодном освещении (белый свет/комбинированный свет, 6000 Лк). Субстратом являлся стерильный вермикулит (фракция – 1-4мм). Инокуляцию проводили в объеме – 50 мкл бактериальной суспензии с титром 10⁹ КОЕ/мл на семя (предпосевная обработка). Семена перед посевом выдерживали

в 70% этаноле 2 мин, а затем 3 раза промывали в стерильном дистилляте. После посева добавляли питательную смесь Прянишникова в объеме 100 мл на стакан следующего состава: (г/л): NH_4NO_3 – 0,24; CaHPO_4 – 0,172; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,025; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,344; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,123; KCl – 0,160.

Полевые испытания проводили согласно методике [Волкогон с соавт., 2010; Доспехов, 1985]. Предпосевную инокуляцию бактериальной суспензией проводили в объеме 2% от веса семян с титром не менее 10^9 КОЕ/мл. Детальное описание постановки и анализа опытов приведено в соответствующих разделах главы 3 настоящей работы.

Агротехнология применения микробной обработки отличается от имеющейся у сельхозпроизводителей лишь необходимостью очищать технику (протравитель семян) перед обработкой семян; проводить обработку максимум за сутки до посева; не подвергать препарат и обработанные семена воздействию прямых солнечных лучей.

2.6. Метагеномное секвенирование нового поколения (NGS)

Препараты ДНК (10-15 нг) использовали в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции для создания и последующего секвенирования ампликонных библиотек. В ПЦР-реакции были использованы универсальные праймеры к вариабельному участку V4 гена 16S рРНК (F515 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) и R806 (GGACTACVSGGGTATCTAAT)) и полимеразы Encyclo («Евроген», Россия). Температурный профиль реакции: 95°C – 30 сек., 50°C – 30 сек., 72°C – 30 сек.; всего 30 циклов [Чирак, 2013]. В праймеры вводили олигонуклеотидные идентификаторы для каждого образца (6 идентификаторов) и служебные последовательности, необходимые для секвенирования Illumina по протоколу фирмы «Roche» (Швейцария). Подготовку проб и секвенирование проводили на приборе GS Junior («Roche», Швейцария) согласно рекомендациям производителя. Таксономический анализ нуклеотидных последовательностей ампликонных библиотек осуществляли с помощью программы QIIME [Caporaso et al., 2010]. В ходе анализа производили разделение библиотек по идентификаторам, проверку качества секвенирования и фильтрацию нуклеотидных последовательностей с отбрасыванием последовательностей длиной менее 200 п.о. и более 1000 п.о. Последовательности объединялись в операционные таксономические единицы (OTU, operational taxonomic units) с использованием 97% порога сходства, выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили методом Uclust, а построение матрицы генетических дистанций и филогенетического древа по методу Fasttree. Таксономическую идентификацию OTU проводили с использованием базы данных Greengenes [DeSantis et al., 2006].

2.7. Полногеномное секвенирование

Образцы штаммов клубеньковых бактерий, выделенных из полевого опыта, в объеме 5 мл суточной культуры были переданы компании ООО «Генотек» (Россия) для проведения секвенирования с использованием техники секвенирования нового поколения (NGS) на платформе Illumina HiSeq2500.

2.8. Биоинформационный и статистический анализ

Первичный сравнительный анализ полученных последовательностей с последовательностями базы данных ГенБанка проводили с помощью программы NCBI Blast [Altschul et al., 1990]. Проверка и редактирование были осуществлены с помощью редактора «BioEdit 7.0.5.2» [Hall, 1999]. Филогенетические деревья были построены в программе Mega 5.1 [Kumar et al., 2004] с помощью алгоритмов Neighbor-Joining NJ [Nei and Kumar, 2000] и Maximum likelihood estimation. Попарные генетические расстояния между последовательностями определяли по двухпараметрической модели Кимуры [Kimura, 1980].

Депонирование секвенированных последовательностей проводили в базу данных Национального Центра Биотехнологической Информации - GenBank NCBI (приложение 2).

Оценку генетического полиморфизма исследуемых хромосомных и симбиотических маркеров проводили на основе анализа баз данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и IMG/MER JGI (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/mer/main.cgi>). Уровень нуклеотидного полиморфизма вычисляли в программе DnaSP 5.10 [Rozas et al., 2010].

В рамках статистического анализа для выявления разброса данных использовалась величина стандартного отклонения. С целью определения достоверности различий исследуемых параметров использовалась величина наименьшей существенной разности для 5%-ного уровня значимости ($HCp_{0,5}$). Статистическую обработку данных и графическое представление полученных результатов проводили с использованием программ Microsoft Excel 2016, STATISTICA 10.

2.9. Анализ общего содержания белка

Использовали метод Кьельдаля, определение проводили в аппарате фирмы Bushi на приборе К-424 (Германия) согласно ГОСТ 10846-91 «Зерно и продукты его переработки» в трехкратной повторности.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изучение биоразнообразия микросимбионтов бобовых культур

Бактерии, способные вступать в азотфиксирующий симбиоз с бобовыми культурами, относят к разным группам α - и β -протеобактерий и в совокупности называют ризобии. Генетическое разнообразие ризобий, также, как и биохимические аспекты растительно-микробных взаимодействий, хорошо изучены. Graham в 1991 году [Graham et al., 1991] к основным рекомендациям для описания новых ризобиальных видов относил совместный анализ как филогенетических, так и на фенотипических признаков и оценку сходства геномов. С тех пор было описано значительное количество новых видов, в большинстве случаев на основе полифазного анализа с использованием ряда генетических маркерных систем, результатов ДНК-ДНК гибридизации и описания различных отличительных фенотипических признаков. Метод анализа последовательностей молекулярных маркеров позволил значительно продвинуться в вопросах ризобиальной таксономии.

Систематическое положение новых описанных видов периодически пересматривается Международным комитетом по систематике прокариот (Подкомитет по таксономии агробактерий и ризобий, ICSP Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium* - <http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy/>). Было опубликовано несколько обзоров по ризобиальной таксономии [Zakhia et al., 2001; Sawada et al., 2003; Willems, 2006], но ни один из них не был специально ориентирован на геномику. Даже с применением современных молекулярно-генетических методик достаточно сложно однозначно разделять уже известные виды клубеньковых бактерий, реклассифицировать их или вводить и описывать новые [Rao et al., 2018]. Вследствие этого актуальным является поиск генетических маркеров, позволяющих идентифицировать и дифференцировать ризобии на внутривидовом уровне.

В ранее проведенных исследованиях были начаты работы по изучению биоразнообразия микросимбионтов различных бобовых культур [Зотов, 2013]. В результате была разработана новая техника генотипирования (*hin*-регион ПЦР, техники saAFLP), позволяющая проводить дифференциацию на уровне вида – группы штаммов. В данной работе исследуемая выборка микросимбионтов была расширена, а к изучению генетического разнообразия штаммов был применен комплексный подход с целью оценки уровня полиморфизма используемых маркеров применительно к группам микросимбионтов отдельных растений. В результате проведенного исследования были предложены экспресс-методики определения генотипов клубеньковых бактерий или КлОЕ, полученных по итогам лабораторных и полевых испытаний.

1.1. Клубеньковые бактерии ГПИ трибы *Viciae* (*Vicia*, *Pisum*, *Lens*, *Lathyrus*)

Взаимодействия между растениями трибы *Viciae* (*Vicia*, *Pisum*, *Lens* and *Lathyrus*) и *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (*Rlv*) считаются одними из наиболее специфичных. Ранее были описаны различные вариации при выборе микросимбионта разными видами и сортами растений, представителей трибы *Viciae* [Laguerre et al., 2003; Mutch and Young, 2004; Alvarez-Martinez et al., 2009]. Примечательно, что культивируемые в Европе растения бобов (*Vicia faba*) строго избирательны к доминирующему *nod*-типу независимо от геномного бэкграунда, тогда как культурный горох (*Pisum sativum*) и дикие бобовые (*Vicia* и *Lathyrus*) менее специфичны в выборе симбионтов [Laguerre et al., 2003; Mutch and Young, 2004].

Клубеньковые изоляты растений, относящихся к родам *Pisum*, *Vicia*, *Lens* и *Lathyrus*, классифицированы в биовар (bv.) *viciae* вида *R. leguminosarum*. Штаммы внутри данного биовара способны к перекрестной инокуляции представленных растений-хозяев, так называемой группы перекрестной инокуляции (ГПИ). Эффективность симбиотической азотфиксации штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae* довольно разная, которая определяется в том числе и нодуляционной конкурентоспособностью конкретного генотипа ризобий, а именно – способностью формировать клубеньки на фоне других вирулентных штаммов [Онищук с соавт., 2017]. В настоящее время известны следующие ризобиальные микросимбионты данных растений: *R. pisi*, *R. fabae*, *R. anhuiense*, *R. laguerreae* (приложение 3).

Подобные растительно-микробные взаимодействия представляются удобным модельным объектом для изучения механизмов бобово-ризобиального симбиоза и выявления генетических маркеров видовой (сортовой) специфичности.

1.1.1. Генетический полиморфизм хромосомных генов 16S рРНК и *rhoB*

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов *rhoB* и 16S рРНК выявил гетерогенность на внутривидовом уровне с выделением нескольких отличных групп, что в свою очередь коррелирует со специфичностью к растению-хозяину, различному географическому происхождению и, следовательно, разной эволюционной истории данных штаммов.

Белок-кодирующие гены, такие как *rhoB*-ген, имеют несколько преимуществ перед РНК-кодирующими генами в качестве молекулярных маркеров. Для филогенетического анализа такие гены могут быть использованы как на аминокислотном, так на нуклеотидном уровнях. А совместное использование нескольких хромосомных маркеров в рамках MLSA анализа позволяет разделять штаммы на уровне вида или более низком уровне [Case et al, 2007].

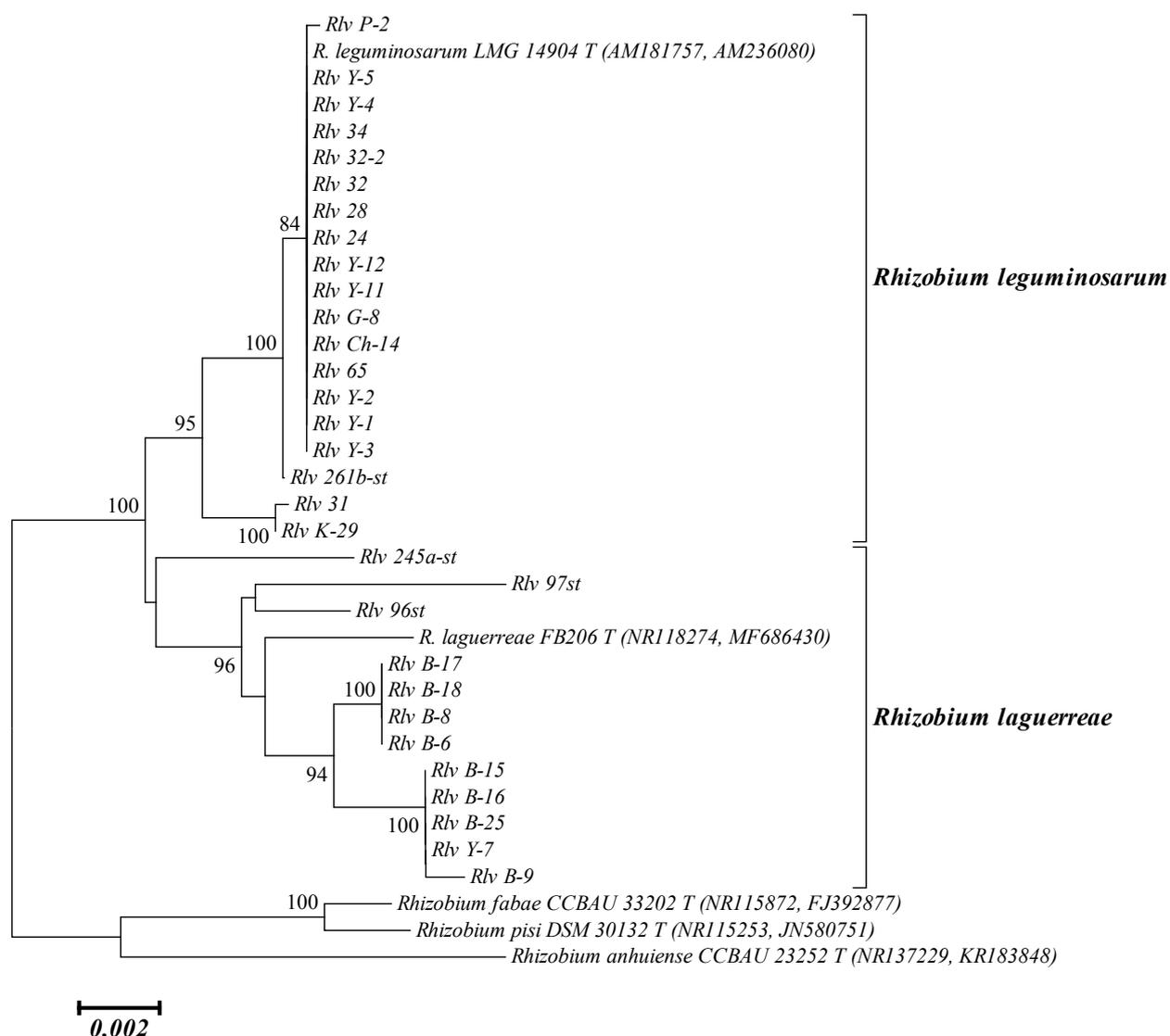


Рисунок III.1. Филогенетическое дерево, построенное на основе совокупных данных сравнительного анализа полных нуклеотидных последовательностей гена *16S* рРНК и фрагмента гена *rpoB* бактерий рода *Rhizobium* (микросимбионтов ГПИ трибы *Viciae*) с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 0,2 заменам на 100 пар оснований (генетическим дистанциям). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap» - анализа 1000 реплик. Значения «bootstrap» ниже 70% не показаны.

Анализ хромосомных маркеров определил принадлежность штаммов из исследуемой выборки к виду *Rhizobium leguminosarum*. Всего достоверно выявляются 5 кластеров: *R. leguminosarum*; штаммы, входящие в одну группу с типовым *R. laguerreae*; *R. fabae*; *R. anhuiense* и *R. pisi* (рис. III.1).

1.1.2. Генетический полиморфизм симбиотического гена *nodD*

Laguette с соавторами в 2003 году было показано, что специфичность ризобий к бобам определяется носителем плазмиды типа *Rlv* 248 (Y00548), в то время как в клубеньках гороха посевного штаммы ризобий с данным *sym*-генотипом встречаются значительно реже. На рисунке III.2. представлено филогенетическое дерево, построенное на основе сравнения данных нуклеотидных последовательностей *nodD* гена, из которого видно, что все штаммы разделились между соответствующими *sym*-генотипам.

Ввиду того, что симбиотические гены отражают специфичность к растению-хозяину [Young, Johnston, 1989; Ueda et al., 1995; Suominen et al., 2001] и географии произрастания, то выявленная закономерность, вероятно, связана с происхождением данных бобовых растений. Родиной бобов считается Средиземноморье, при этом в диком виде культура не встречается, в связи с чем, будучи интродуцированной культурой, она имеет ограниченный круг естественных микросимбионтов, что приводит к низкому уровню генетического разнообразия симбиотической части бактериальных геномов (*sym-4*). Напротив, горох имеет множество природных родственников, например, рода *Lathyrus*, симбионты которого могут успешно выступать донорами симбиотических генов для взаимодействия с *Pisum sativum*, что и обуславливает наблюдаемое генетическое разнообразие его симбиотических генов – *sym-1*, *sym-2*, *sym-3* (рис. III.2.).

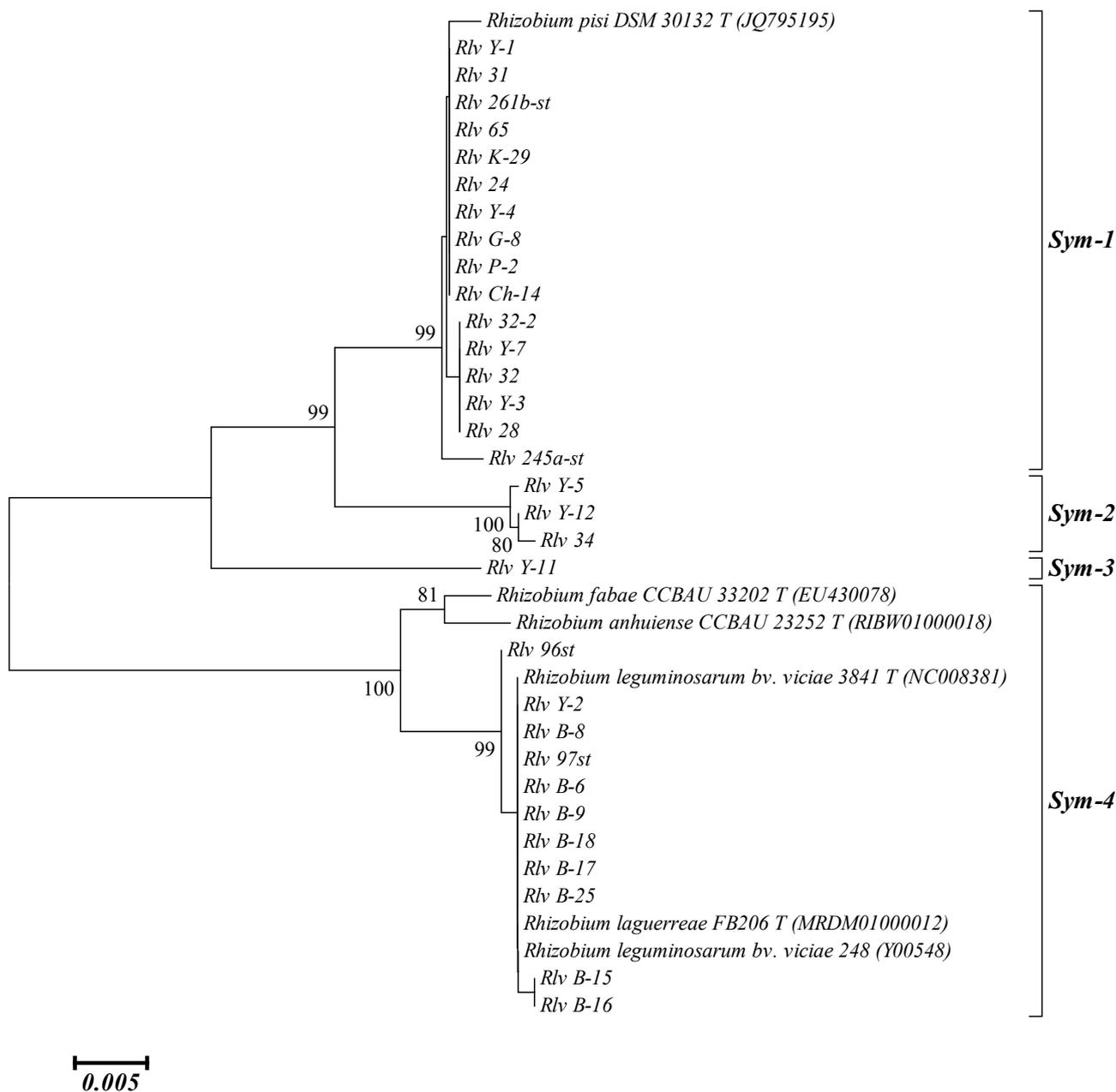


Рисунок III.2. Филогенетическое дерево, построенное на основе данных сравнительного анализа полных нуклеотидных последовательностей гена *nodD* бактерий рода *Rhizobium* (микросимбионтов ГПИ трибы *Viciae*) с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 0,5 заменам на 100 пар оснований (генетическим дистанциям). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap»-анализа 1000 реплик. Значения «bootstrap» ниже 70% не показаны.

1.1.3. Генетический полиморфизм хромосомного межгенного *hin*-региона

При анализе межгенного *hin*-региона исследуемые штаммы разделились на 2 группы генотипов: IA-генотип, определяющий ризобии, большинство из которых были выделены из клубеньков гороха, и IB-генотип, определяющий ризобии, выделенные из клубеньков бобов. При сравнении нуклеотидных последовательностей *hin*-региона генотипа *R.*

leguminosarum IB (327 п.о.), входящих в одну группу с типовым штаммом *R. laguerreae* FB206 T (470 п.о.), выявленное сходство составило 100%, что позволяет отнести данные штаммы к виду *R. laguerreae* (рис. III.3).

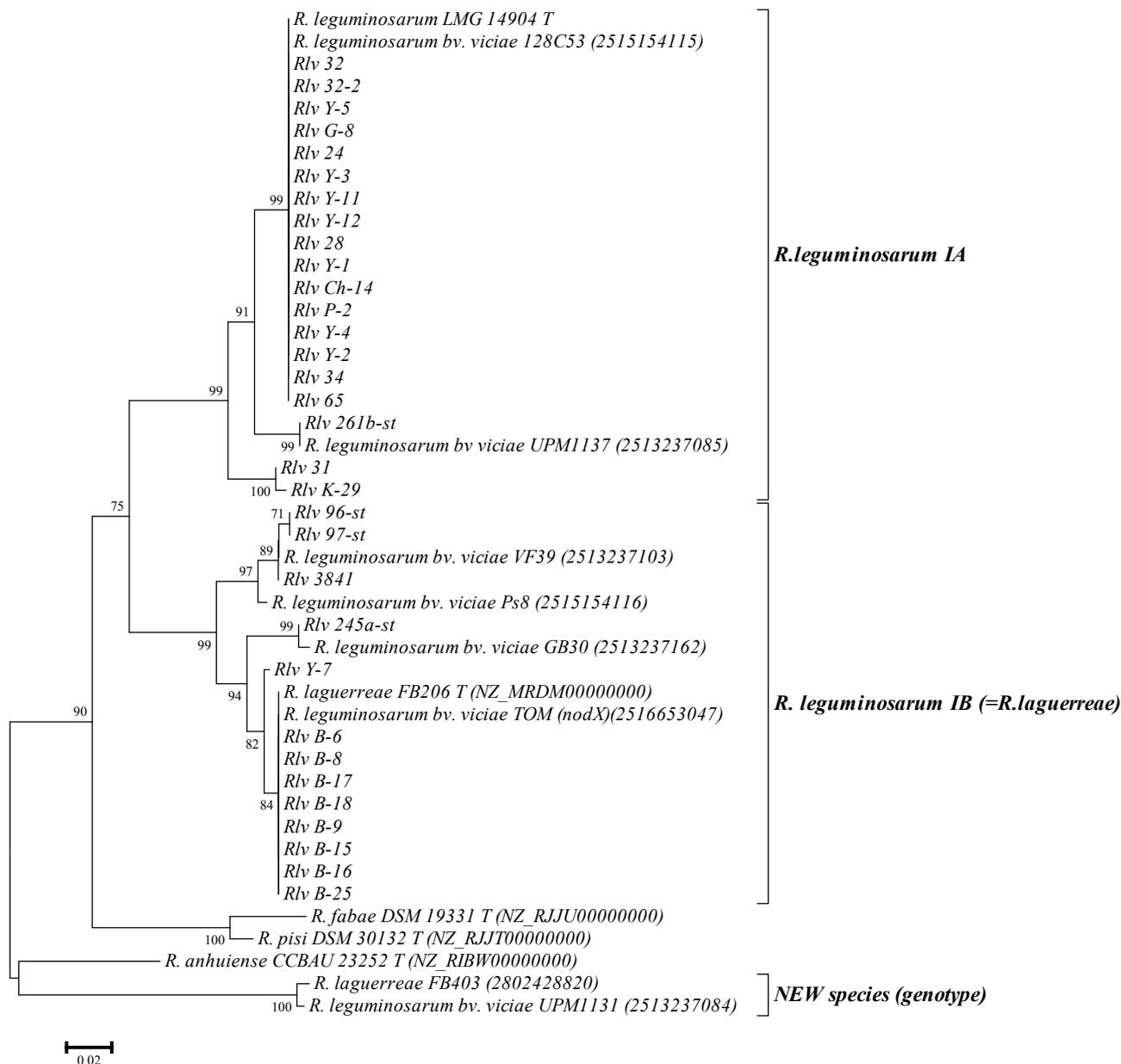


Рисунок III.3. Филогенетическое дерево, построенное по нуклеотидным последовательностям маркера - *hin*-регион, специфичного для рода *Rhizobium* sp. (микросимбионтов ГПИ трибы *Viciae*) с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 2 заменам на 100 пар оснований (генетическим дистанциям). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap» - анализа 1000 реплик. Значения «bootstrap» ниже 70% не показаны.

Сопоставляя данные исследованных генетических маркеров, можно заключить, что существует положительная корреляция между хромосомным *hin*-регионом и *sym*-генами: генотип I/A сцеплен с *sym*-генотипом, характерным для симбионтов *Pisum sativum*, а генотип I/B - с присущим симбионтам *Vicia faba*.

Совместное использование таких методик, как *hin*-регион ПЦР и *nodD*-RFLP, позволяет проводить экспресс идентификацию и дифференциацию микросимбионтов растений ГПИ, а также КлОЕ, образовавших клубеньки на корнях этих растений.

В таблице III.1 представлена структура *hin*-региона у исследуемых штаммов и штаммов-микросимбионтов растений ГПИ, полные геномы которых представлены в открытых базах данных.

Генотип *Rhizobium anhuiense* относительно генотипа *R. leguminosarum* IA отличает вставка в 338 п.о. в промоторной области второй копии гена тРНК-Глу (СТС). При этом сходство между генотипами составляет 86%.

Относительно штамма *R. pisi* DSM 30132 Т генотип *Rhizobium fabae* отличает вставка в 1350 п.о., состоящая из гена FkbM family methyltransferase и дополнительной копии гена тРНК-Глу (СТС). На остальной длине сравнения (403 п.о.) сходство *R. fabae* ССВАУ 33202 Т с *R. pisi* DSM 30132 Т составило 97%.

Rhizobium leguminosarum IA (Ia) - самый распространенный генотип ризобий - симбионтов растений трибы Vicieae (горох, бобы, чина, чечевица и др.), клевера и фасоли. Генотип *Rhizobium leguminosarum* IB (= *Rhizobium laguerreae*) относительно генотипа *R. leguminosarum* IA отличает вставка в 75 п.о. в промоторной области второй копии гена тРНК-Глу (СТС). Новый генотип, представленный штаммом *Rhizobium leguminosarum* UPM1131, образован посредством вставки в 176 п.о. между 2 и 3 копиями гена тРНК-Глу.

В таблице III.2 представлен процент сходства нуклеотидных последовательностей *hin*-региона штаммов-симбионтов растений ГПИ трибы Vicieae на внутривидовом и межвидовом уровнях. Наиболее полиморфной на внутривидовом уровне является группа штаммов, которая принадлежит к генотипу *R. leguminosarum* IB (= *R. laguerreae*), сходство составило 92%. У группы штаммов *R. leguminosarum* IA - 94%. На межвидовом уровне наиболее отдаленными являются группы штаммов генотипов *R. anhuiense* и *R. fabae* (44%), а наиболее близкими - *R. pisi* и *R. fabae* (93%).

Таблица III.1. Структура *hin*-региона различных генотипов штаммов-симбионтов растений ГПИ трибы Vicieae.

№	Генотип	Типовой штамм	Кол-во штаммов	Структура	Длина <i>hin</i> -региона, п.о.	Уровень внутривидового (внутри генотипа) полиморфизма	Номер последовательности <i>hin</i> -региона (генома) базах данных GenBank NCBI / IMG/MER JGI
1	<i>Rhizobium anhuiense</i>	CCBAU 23252 T	1		737	-	NZ_RIBW00000000
2	<i>Rhizobium fabae</i>	CCBAU 33202 T	1		1753	-	NZ_RJJU00000000
3	<i>Rhizobium leguminosarum</i> IA (Ia)	LMG 14904 T	22		401 248 (для Ia)	6%	KC462465 (<i>Rlv</i> 32-2)
4	<i>Rhizobium leguminosarum</i> IB (= <i>Rhizobium laguerreae</i>)	FB206 T	18		470	8%	NZ_MRDM00000000
5	<i>Rhizobium pisi</i>	DSM 30132 T	1		403	-	NZ_RJJT00000000
6	Новый генотип	UPM1131	2		501	2%	2513237084

Таблица III.2. Сходство нуклеотидных последовательностей *hin*-региона штаммов-симбионтов растений ГПИ трибы *Viciae* на внутривидовом и межвидовом уровнях, %.

	<i>R.leg. LMG 14904 T</i>	<i>R.leg. 128C53</i>	<i>Rlv 65 - IA (16)</i>	<i>Rlv 31</i>	<i>Rlv K-29</i>	<i>Rlv 261b-st - IA (2)</i>	<i>Rlv 245a-st</i>	<i>R.leg. GB30</i>	<i>Rlv 96-st - IB (2)</i>	<i>R.leg. 3841 - IB (2)</i>	<i>R.leg. Ps8</i>	<i>R. laguerreae FB206 T</i>	<i>Rlv B-6 - IB (9)</i>	<i>Rlv Y-7</i>	<i>R. anhuiense CCBAU 23252 T</i>	<i>R. fabae CCBAU 33202 T</i>	<i>R. pisi DSM 30132 T</i>	<i>R. laguerreae FB403</i>	<i>R. leg. UPM1131</i>
<i>R.leg. LMG 14904 T</i>	100																		
<i>R.leg. 128C53</i>	100	100																	
<i>Rlv 65 - IA (16)</i>	100	88	100																
<i>Rlv 31</i>	94	85	96	100															
<i>Rlv K-29</i>	94	84	96	99	100														
<i>Rlv 261b-st - IA (2)</i>	95	85	94	94	94	100													
<i>Rlv 245a-st</i>	83	67	87	88	87	86	100												
<i>R.leg. GB30</i>	83	66	87	87	87	86	99	100											
<i>Rlv 96-st - IB (2)</i>	86	67	89	88	88	87	93	93	100										
<i>R.leg. 3841 - IB (2)</i>	86	67	89	88	88	87	93	93	99	100									
<i>R.leg. Ps8</i>	87	68	89	88	88	87	96	96	96	97	100								
<i>R. laguerreae FB206 T</i>	86	68	89	89	89	88	92	92	93	94	93	100							
<i>Rlv B-6 - IB (9)</i>	86	68	89	89	89	88	93	92	93	94	93	99	100						
<i>Rlv Y-7</i>	86	68	89	89	88	87	93	92	93	93	93	98	98	100					
<i>R. anhuiense CCBAU 23252 T</i>	85	63	87	87	87	85	81	81	81	82	81	83	82	82	100				
<i>R. fabae CCBAU 33202 T</i>	83	70	83	84	84	84	69	69	69	69	69	70	70	69	44	100			
<i>R. pisi DSM 30132 T</i>	86	81	88	89	89	88	85	85	86	86	86	86	86	86	85	93	100		
<i>R. laguerreae FB403</i>	91	84	93	93	92	91	90	90	89	90	90	91	91	91	86	82	86	100	
<i>R. leg. UPM1131</i>	92	84	94	93	93	92	91	90	90	91	91	91	91	91	86	83	88	98	100

1.2. Клубеньковые бактерии – симбионты фасоли (*Phaseolus vulgaris*)

Фасоль обыкновенная способна вступать в симбиоз с широким спектром азотфиксирующих клубеньковых бактерий, большая часть которых представлена различными видами рода *Rhizobium*. Выбор микросимбионта обусловлен разными внешними и внутренними факторами, поэтому достаточно сложно выявить специфичность в данном виде растительно-микробных взаимодействий. Обнаружение, изучение и оценка генетического разнообразия новых клубеньковых бактерий, образующих активные клубеньки на корнях фасоли, приблизят исследователей к решению этого вопроса [Martinez-Romero E., 2003]. Фасоль обыкновенная (*Phaseolus vulgaris* L.) представляет особый интерес в исследовании специфичности симбиотических взаимодействий, т. к. способна к перекрестному заражению большим числом микросимбионтов неродственных видов бобовых растений.

В настоящее время известны следующие ризобияльные микросимбионты фасоли: *R. leguminosarum*, *R. vallis*, *R. acidisoli*, *R. phaseoli*, *R. etli*, *R. mesoamericanum*, *R. tibeticum*, *R. lusitanum*, *R. leucaenae*, *Pararhizobium giardinii*, *R. hidalgonense*, *R. tropici* type B, *R. aethiopicum*, *R. anhuense*, *R. esperanzae*, *R. gallicum*, *R. azibense*, *R. ecuadoreense*, *R. freirei*, *Sinorhizobium fredii* (приложение 3).

1.2.1. Генетический полиморфизм хромосомных генов 16S рРНК и *rpoB*

Исследуемая коллекция микроорганизмов представляла собой выборку штаммов клубеньковых бактерий, выделенных из клубеньков с корнями *Phaseolus vulgaris*. Генетическая идентификация и определение таксономического положения штаммов базировались на данных сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей нескольких «генов домашнего хозяйства». В настоящей работе нами были использованы генетические маркеры с различной разрешающей способностью на внутривидовом уровне. Проведенное генотипирование клубеньковых бактерий привело к выявлению в исследуемой выборке наименьшей таксономической единицы – группа штаммов.

Таксономическая кластеризация исследуемых штаммов по хромосомным маркерам 16S рРНК и *rpoB* выявила принадлежность к двум видам рода *Rhizobium* – *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* и недавно переименованному роду *Pararhizobium giardinii* [Mousavi et al., 2015] (рис. III.4).

1.2.2. Генетический полиморфизм симбиотических генов *nodC* и *nifH*

Одним из основных механизмов, способствующих увеличению биоразнообразия ризобий, является горизонтальный перенос генов - ГПГ [Wang et al, 2016]. На макроэволюционном уровне ГПГ обуславливает широкую филогенетическую диверсификацию ризобий в результате введения новых бактерий в область симбиотических взаимодействий с бобовыми растениями [Проворов и др., 2010]. Распространение фасоли обыкновенной из центров возникновения в регионы интенсивного возделывания, из Южной и Центральной Америки в Европу и Африку, привело к возникновению новых симбионтов [Aguilar et al., 2004]. На рисунке III.5 представлено филогенетическое дерево, построенное на основе совокупных данных сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей симбиотических генов бактерий рода *Rhizobium* – *nodC* (804 п.о.) и *nifH* (407 п.о.). В анализе были использованы последовательности генов типовых штаммов, выделенных из клубеньков фасоли, либо способные инокулировать фасоль.

К группе штаммов *sym-1* были отнесены культуры ризобий видов *R. ecuadorensis* (Эквадор, Южная Америка), *R. vallis* (Китай, Азия), *R. aethiopicum* (Эфиопия, Африка), *R. anhuiense* (Китай, Азия), *R. acidisoli* (Мексика, Северная Америка), *R. esperanzae* (Мексика, Северная Америка), *R. leguminosarum*; *sym-2* – *R. hidalgonense* (Мексика, Северная Америка), *R. phaseoli* (США, Северная Америка), *R. etli* (Мексика, Северная Америка), *R. leguminosarum*; *sym-3* – *R. gallicum* (Франция, Европа), *R. azibense* (Тунис, Африка); *sym-4* – *Pararhizobium giardinii* (Франция, Европа); *sym-5* – *R. leucaena* (Бразилия, Южная Америка), *R. tropici type B* (Бразилия, Южная Америка), *R. lusitanum* (Португалия, Европа), *R. freirei* (Бразилия, Южная Америка); *sym-6* – *Ensifer fredii*; *sym-7* – *R. tibeticum* (Китай, Азия); *sym-8* – *R. mesoamericanum* (Мексика, Северная Америка).

Исследуемые штаммы кластеризуются в 3 группы: *sym-1* и *sym-2* – *R. leguminosarum* с высоким уровнем полиморфизма, в эти симбиовары вошли генетически удаленные штаммы разных видов, что вероятно свидетельствует о горизонтальном переносе симбиотических генов между разными микросимбионтами фасоли; и более однородную *sym-4* – *P. giardinii*. Представленный полиморфизм ризобиальных штаммов, способных инокулировать фасоль, очевидно обусловлен независимой эволюционной историей данных генов.

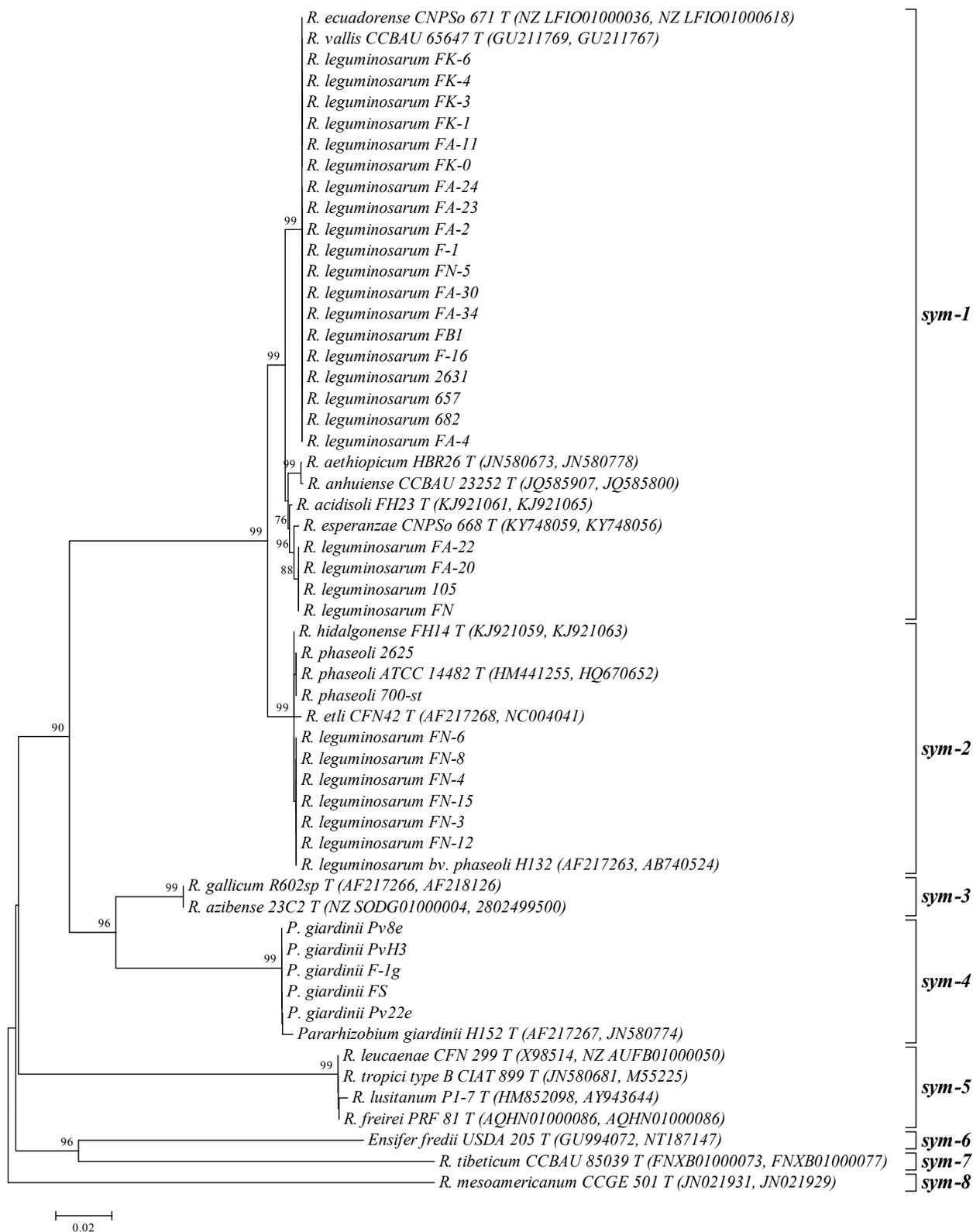


Рисунок III.5. Филогенетическое дерево, построенное на основе совокупных данных сравнительного анализа полных нуклеотидных последовательностей генов *nodC* и *nifH* бактерий рода *Rhizobium* (микросимбионтов фасоли) с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 2 заменам на 100 пар оснований (генетическим дистанциям). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap» - анализа 1000 реплик. Значения «bootstrap» ниже 70% не показаны.

1.2.3. Генетический полиморфизм хромосомного межгенного *hin*-региона

В соответствии с выявленной кластеризацией штаммов по совокупности хромосомных и симбиотических маркеров видовая принадлежность штаммов из исследуемой выборки в рамках рода *Rhizobium* sp. отличалась от заявленной в исходных коллекциях. Анализ микросимбионтов фасоли на основе родоспецифичного маркера *hin*-регион позволил уточнить таксономическое положение штаммов и выявить внутривидовое разнообразие.

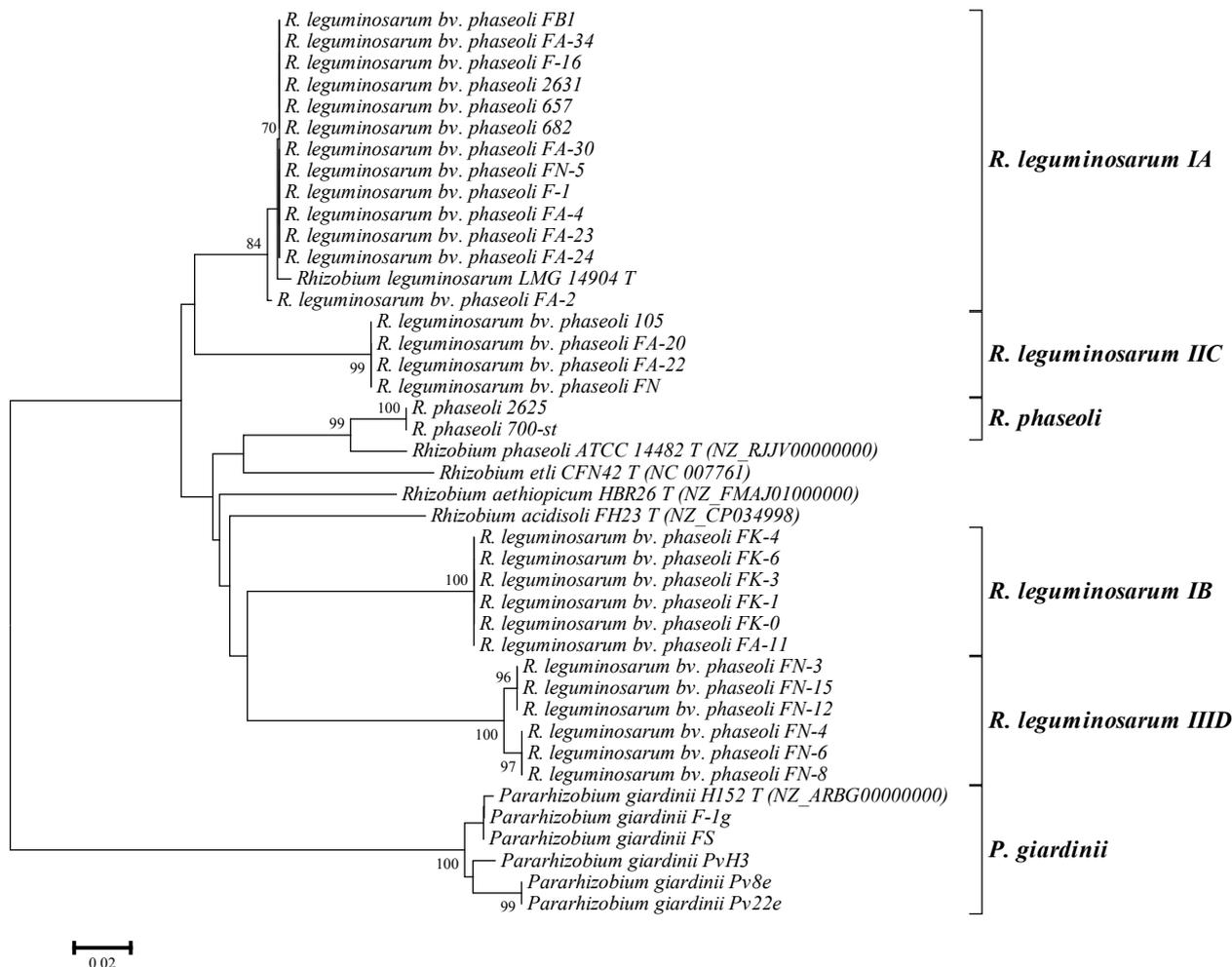


Рисунок III.6. Филогенетическое дерево, построенное по нуклеотидным последовательностям маркера - *hin*-регион, специфичного для рода *Rhizobium* sp. (микросимбионтов фасоли) с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 2 заменам на 100 пар оснований (генетическим дистанциям). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap» - анализа 1000 реплик. Значения «bootstrap» ниже 70% не показаны.

По данным секвенирования исследуемых штаммов по *hin*-региону было построено филогенетическое дерево с применением аналогичных последовательностей типовых штаммов (рис. III.6). В качестве референсных были взяты типовые штаммы, выделенные из клубеньков фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*), известные на данный момент и имеющие аннотации полногеномного секвенирования в открытом доступе в базах данных

GenBank NCBI и IMG/MER JGI (20 видов *Rhizobium* sp.). В филогенетическое дерево не вошли последовательности штаммов, имеющие сходство менее 80% с генотипом *R. leguminosarum* IA, который был взят в качестве базового. Выборка фасолевых штаммов по данному хромосомному маркеру была разделена на 6 генотипов в рамках выявленных ранее видов *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium phaseoli* и *Pararhizobium giardinii*, что соответствует данным, полученным ранее для меньшей выборки штаммов со схожим происхождением [Зотов с соавт., 2013].

При анализе нуклеотидных последовательностей *hin*-региона генотипа *R. leguminosarum* ПС (656 п.о.) и типового штамма *R. acidosoli* FH13 T (497 п.о.) сходство составило 87%. Таким образом, генотип *R. leguminosarum* ПС предположительно может быть выделен в самостоятельный вид.

При сравнении нуклеотидных последовательностей *hin*-региона генотипа *R. leguminosarum* ПИД (397 п.о.) и типового штамма *R. hidalgonense* FH14 T (4210 п.о.) была выявлена протяженная вставка (3926 п.о.) между первой и второй копиями гена тРНК-Глу, представленная гипотетическим протеином и геном пептидазы. Сходство нуклеотидных последовательностей без учета вставки составило 100%, что подтверждает их общее эволюционное происхождение. Штаммы данных генотипов также имеют высокий процент сходства по совокупности остальных маркеров (16S рРНК, *rpoB*, *nodC*, *nifH*), что дает основание группу исследуемых штаммов генотипа *R. leguminosarum* ПИД отнести к виду *R. hidalgonense*.

При сравнении нуклеотидных последовательностей *hin*-региона генотипа *R. phaseoli* (524 п.о.) и типового штамма *R. aethiopicum* HBR26 T (398 п.о.) сходство составило 89%, что ниже порогового значения внутривидового полиморфизма ($\geq 90\%$). При сравнении нуклеотидных последовательностей *hin*-региона генотипа *R. phaseoli* (524 п.о.) и типового штамма *R. anhuiense* ССВАУ 23252 (737 п.о.) была выявлена вставка в 215 п.о. между первой и второй копиями гена тРНК-Глу. Сходство нуклеотидных последовательностей составило 89%, что ниже порогового значения внутривидового полиморфизма ($\geq 90\%$). Также, несмотря на высокий процент сходства (89%) исследуемых штаммов 2625 и 700st с типовым *R. phaseoli* АТСС 14482 T, однозначно отнести их к данному виду нельзя. Ближайшего родственника для видовой идентификации из имеющихся данных в открытом доступе найдено не было.

У штамма *R. hidalgonense* FH14 T нетипичная структура *hin*-региона: 2 копии гена тРНК-Глу, расположенных на разных цепях ДНК, и две протяженные вставки, представленные генами hypothetical protein и peptidase M41-like protein. Сходную структуру имеет штамм *R. tibeticum* ССВАУ85039 T: 2 копии гена тРНК-Глу, расположенных на разных цепях ДНК.

Таблица III.3. Структура *hin*-региона различных генотипов штаммов-симбионтов фасоли обыкновенной.

№	Генотип	Типовой штамм	Кол-во штаммов	Структура	Длина <i>hin</i> -региона, п.о.	Уровень внутривидового (внутри генотипа) полиморфизма	Номер последовательности <i>hin</i> -региона (генома) базах данных GenBank NCBI / IMG/MER JGI
1	<i>Rhizobium acidisoli</i>	FH13 T	1		497	-	NZ_CP034998
2	<i>Rhizobium aethiopicum</i>	HBR26 T	1		398	-	NZ_FMAJ00000000
3	<i>Rhizobium anhuiense</i>	C15	3		737	-	NZ_NWSN01000001
4	<i>Rhizobium azibense</i>	23C2 T	1		842	-	NZ_SODG01000001
5	<i>Rhizobium azibense</i> II	GR42	2		1232	1%	NZ_SMBJ01000001
6	<i>Rhizobium esperanzae</i>	CNPSo 668 T	1	н/д	н/д	н/д	NZ_CP013500
7	<i>Rhizobium etli</i>	CFN42 T	1		398	-	NC_007761
8	<i>Rhizobium freirei</i>	PRF 81 T	1		364	-	NZ_AQHN00000000
9	<i>Rhizobium gallicum</i>	R602sp T	1		401	-	NZ_ARDC00000000
10	<i>Rhizobium gallicum</i> II	IE4872	1		747	-	NZ_CP017101
11	<i>Pararhizobium giardinii</i>	H152 T	6		262	4%	NZ_ARBG00000000
12	<i>Rhizobium hidalgonense</i>	FH14 T	1		4210	-	NZ_LODW00000000
13	<i>Rhizobium leguminosarum</i> IA (Ia)	LMG 14904 T	14		401 248 (для Ia)	1%	KC462497 (<i>R. leguminosarum</i> FA-4)

14	<i>Rhizobium leguminosarum</i> Ib	FK-4	6		470	0%	KC462495
15	<i>Rhizobium leguminosarum</i> IIC (= <i>Rhizobium ecuadorensis</i>)	CNPSo 671 T	5		538	6%	NZ_LFIO00000000
16	<i>Rhizobium leguminosarum</i> IIID (IIId)	FN-6	6		397 249 (для IIId)	0%	KC462501
17	<i>Rhizobium leucaena</i>	CFN 299 T	2		350	0%	NZ_AUFB00000000
18	<i>Rhizobium lusitanum</i>	P1-7 T	1		353	-	NZ_FMAF00000000
19	<i>Rhizobium mesoamericanum</i>	CCGE 501 T	1		2756	-	2738541345
20	<i>Rhizobium phaseoli</i>	ATCC 14482 T	3		524	11%	NZ_RJVV00000000
21	<i>Rhizobium tibeticum</i>	CCBAU 85039 T	1		317	-	NZ_FNXB00000000
22	<i>Rhizobium tropici</i>	CIAT 899 T	1		360	-	NC_020059
23	<i>Rhizobium vallis</i>	CCBAU 65647 T	1		400	-	NZ_RJTH00000000

В рамках группы *R. anhuiense* штаммы C15, J3, JX3 относительно типового ССВАУ 23252 Т отличаются фрагментом в 338 п.о. в промоторной области 2 копии гена тРНК-Глу (СТС). При этом сходство между данными генотипами составляет 89%, что дает основание выделить их в самостоятельный вид. Штамм *Rhizobium azibense* GR42 от типового штамма *R. azibense* 23С2 Т отличает вставка в 266 п.о., состоящая из гена phage integrase family protein. На остальной длине сравнения (842 п.о.) сходство штаммов GR42 и IE4868 данной группы с *R. azibense* 23С2 Т составило 73%, что ставит под сомнение принадлежность этих симбионтов фасоли к данному виду.

Штамм генотипа *R. gallicum* II значительно отличается от типового *R. gallicum* R602sp Т (сходство менее 30%), что ставит под сомнение принадлежность его к данному виду.

По совокупности хромосомных маркеров (16S рРНК, *rpoB*) не было определено однозначного вывода по близости генотипа *Rhizobium gallicum* с другими видами *Rhizobium* sp. С помощью *hin*-регион генотипирования было выявлено, что данный штамм *R. gallicum* R602sp, скорее всего, принадлежит к виду *R. leguminosarum* IA: *R. leguminosarum* LMG 14904 Т (сходство - 98%), *R. leguminosarum* 682 - IA (сходство - 99%), *R. leguminosarum* FA-2 (сходство - 100%). Следовательно, штамм *Rhizobium gallicum* R602sp Т предположительно можно отнести к виду *R. leguminosarum* IA генотипа (табл. III.4).

Нуклеотидная последовательность типового штамма *R. ecuadorensis* CNPSo 671 Т имеет сходство 94% с *hin*-регионом генотипа *R. leguminosarum* IIC. Таким образом, штаммы этого группы можно уверенно отнести к виду *R. ecuadorensis*. При этом они отличаются вставкой в 117 п.о. в промоторной области второй копии гена тРНК-Глу (СТС).

У штамма *R. mesoamericanum* DSM 28449 Т между копиями тРНК-Глу находятся две протяженные вставки общей длиной 1107 п.о., представленные двумя генами: Ketosteroid isomerase homolog и Protein of unknown function (DUF1236).

Нуклеотидная последовательность типового штамма *R. vallis* ССВАУ 65647 Т имеет сходство 90% с *hin*-регионом генотипа *R. pisi*.

В таблице III.4. отображено сходство нуклеотидных последовательностей *hin*-региона штаммов-симбионтов фасоли. На межвидовом уровне наиболее отдаленными от остальных генотипов оказались группы штаммов *R. mesoamericanum* ССГЕ 501 Т и *R. tibeticum* ССВАУ 85039 Т ($\leq 31\%$).

Таблица III.4. Сходство нуклеотидных последовательностей *hin*-региона штаммов-симбионтов растений ГПИ трибы Vicieae на внутривидовом и межвидовом уровнях, %. **1** - *R. leguminosarum* LMG 14904 T; **2** - *R. leguminosarum* 682 - IA (12); **3** - *R. leguminosarum* FA-2; **4** - *R. aethiopicum* HBR26 T; **5** - *R. acidosoli* FH13 T; **6** - *R. leguminosarum* 105 - IIC (4); **7** - *R. ecuadorensis* CNPSo 671 T; **8** - *R. leguminosarum* FK-4 - IB (6); **9** - *R. leguminosarum* FN-12; **10** - *R. leguminosarum* FN-3 - IIID (2); **11** - *R. leguminosarum* FN-6 - III d (3); **12** - *R. phaseoli* 700-st (2); **13** - *R. phaseoli* ATCC 14482 T; **14** - *R. etli* CFN 42 T; **15** - *P. giardinii* H152 T; **16** - *P. giardinii* Pv8e (2); **17** - *P. giardinii* FS (2); **18** - *P. giardinii* PvH3 (2); **19** - *R. anhuiense* J3; **20** - *R. anhuiense* JX3; **21** - *R. anhuiense* C15; **22** - *R. azibense* 23C2 T; **23** - *R. azibense* GR42; **24** - *R. azibense* IE4868; **25** - *R. gallicum* R602sp T; **26** - *R. gallicum* IE4872; **27** - *R. leucaenae* CFN 299 T; **28** - *R. leucaenae* CPAO 29.8; **29** - *R. lusitanum* P1-7 T; **30** - *R. mesoamericanum* CCGE 501 T; **31** - *R. tibeticum* CCBAU 85039 T; **32** - *R. tropici* type B CIAT 899 T; **33** - *R. freirei* PRF 81 T; **34** - *R. vallis* CCBAU 65647 T.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34			
1	100																																				
2	99	100																																			
3	98	99	100																																		
4	81	86	87	100																																	
5	82	86	86	86	100																																
6	84	88	88	86	82	100																															
7	82	82	82	82	77	94	100																														
8	84	64	64	62	61	74	79	100																													
9	78	83	84	83	82	84	82	61	100																												
10	78	83	84	83	82	85	83	61	99	100																											
11	79	78	79	79	77	81	84	81	97	97	100																										
12	83	86	86	86	74	78	71	65	81	81	78	100																									
13	83	84	84	85	75	78	70	67	82	82	80	89	100																								
14	82	87	87	87	83	84	80	62	82	82	78	85	84	100																							
15	67	63	64	60	65	64	70	64	62	62	67	62	62	61	100																						
16	65	61	62	61	65	64	70	62	59	59	63	61	62	60	96	100																					
17	68	64	64	61	66	64	32	63	59	59	64	61	63	61	99	96	100																				
18	66	62	63	60	63	64	71	62	59	59	63	61	61	61	96	96	96	100																			
19	67	43	43	44	43	42	89	42	42	41	60	44	40	42	31	31	31	31	100																		
20	65	42	42	42	43	40	88	42	41	40	54	44	40	41	31	31	31	31	94	100																	
21	65	42	42	42	42	40	88	42	41	40	53	44	40	41	31	31	31	31	94	99	100																
22	50	71	71	71	64	59	66	37	66	66	47	63	64	60	31	31	31	30	36	31	31	100															
23	47	60	60	63	59	55	61	37	61	61	47	59	64	62	31	31	31	31	31	31	31	72	100														
24	47	60	60	62	59	54	61	37	61	61	47	59	64	62	31	31	31	31	31	31	31	72	99	100													
25	98	99	100	43	49	42	89	48	43	42	51	43	41	44	31	31	31	31	92	90	90	38	31	31	100												
26	36	22	22	30	22	17	22	34	29	29	47	21	21	27	36	36	29	35	30	29	29	19	16	16	29	100											
27	45	40	39	39	38	40	69	37	38	39	42	40	38	37	30	30	30	29	71	70	70	73	73	73	70	30	100										
28	45	40	39	39	38	40	69	37	38	39	42	40	38	37	30	30	30	29	71	70	70	73	73	73	70	30	100	100									
29	42	43	43	43	43	44	43	39	43	44	43	44	44	42	30	30	30	29	81	78	78	34	34	34	77	31	85	85	100								
30	16	9	9	10	8	6	7	12	14	13	16	15	7	10	16	16	16	16	16	14	14	4	3	3	9	5	10	10	11	100							
31	13	10	31	31	31	31	31	10	31	30	12	12	30	12	12	12	12	12	31	31	31	20	19	19	31	8	12	12	11	19	100						
32	34	41	41	41	42	42	41	37	40	40	36	41	41	41	30	30	30	29	78	77	77	36	28	27	76	23	81	81	87	11	25	100					
33	34	43	42	41	41	41	41	26	41	40	36	41	40	41	30	30	30	30	77	76	76	35	27	26	75	23	80	80	87	15	20	87	100				
34	53	43	43	42	48	42	91	42	41	41	53	40	40	42	41	32	32	31	86	84	84	33	32	32	86	30	70	70	78	11	31	75	75	100			

1.2.4. Оценка внутривидового полиморфизма при помощи saAFLP

В данной работе была применена модификация метода AFLP, получившая название single adapter AFLP [Valsangiacomo et al., 1995], с использованием редкощепящих эндонуклеаз рестрикции *Xba*I (сайт рестрикции - T[^]CTAGA), *Xma*II (сайт рестрикции - C[^]TAGG), *Asu*NI (сайт рестрикции - G[^]CTAGC) применительно к изучению генетического разнообразия микросимбионтов фасоли (Рис. III.7).

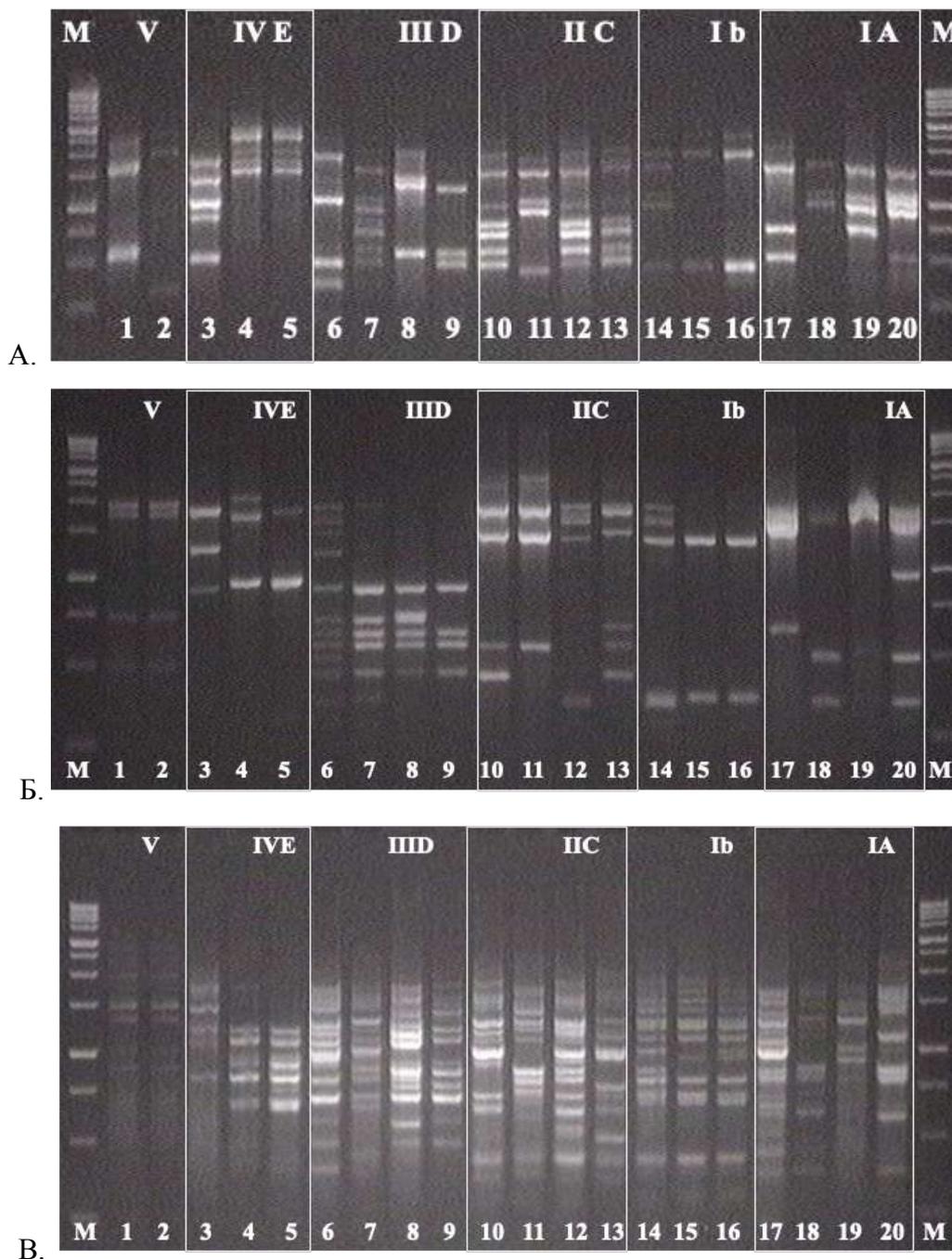


Рисунок III.7. saAFLP анализ с использованием эндонуклеаз рестрикции (А. *Xba*I, Б. *Xma*II, В. *Asu*NI). Дорожки: штаммы 1 - 2625, 2 - В-9623, 3 - FS, 4 - Pv22e, 5 - Pv8e, 6 - FN-8, 7 - FN-6, 8 - FN-12, 9 - FN-3, 10 - 105, 11 - FN, 12 - FA-22, 13 - FA-20, 14 - FK-0, 15 - FK-4, 16 - FK-2, 17 - FA-24, 18 - 2631, 19 - FN-5, 20 - FA-4.

По данным saAFLP каждая из применяемых рестриктаз разделила выборку штаммов на 6 генотипов, что коррелировало с результатами *hin*-регион ПЦР и сравнительным анализом нуклеотидных последовательностей этого межгенного региона [Зотов, 2013].

В результате проведенных работ в качестве экспресс-методики определения генотипов ризобий или КлОЕ, образующих клубеньки на корнях фасоли, предлагается использовать методику *hin*-регион ПЦР, позволяющую проводить дифференциацию штаммов на уровне вида. В качестве дополнительного подтверждающего метода возможно применение фингерпринтинга saAFLP с использованием одной из представленных выше редкощепящих рестриктаз (более дорогостоящая и длительная методика) с выявлением групп штаммов.

1.3. Клубеньковые бактерии – симбионты сои (*Glycine max*)

Соя вступает в симбиоз с клубеньковыми бактериями нескольких видов: медленнорастущими *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii*, *B. liaoningense* [Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями, 2002; Willems, 2006] и быстрорастущими *Sinorhizobium (Ensifer) fredii*, *S. xinjiangensis* [Chen et al., 1988] и *Mesorhizobium thianshanense* [Chen et al., 1995]. В настоящее время известны следующие брадиризовиальные микросимбионты сои: *B. japonicum*, *B. diazoefficiens*, *B. huanghuaihaiense*, *B. liaoningense*, *B. daqingense*, *B. ottawaense*, *B. elkanii*.

Типичными микросимбионтами культурной сои в почвах выступают медленнорастущие ризобии видов *B. japonicum* и *B. diazoefficiens*. Взаимодействие местных ризобий сои между собой, а также с интродуцированными штаммами, может приводить к возникновению новых генотипов микросимбионтов, которые обуславливают гетерогенность популяций этих микроорганизмов, что в свою очередь влияет как на эффективность бобово-ризовиальных симбиозов, так и на плодородие почвы в целом.

1.3.1. Генетический полиморфизм хромосомных маркеров

С целью подтверждения таксономического положения исследуемых штаммов было проведено генотипирование соевых микросимбионтов по хромосомным маркерам – генам *16S rPHK* и *rpoB*. Выборка штаммов была разделена на три вида: *B. japonicum* (USDA 123, USDA 6), *B. diazoefficiens* (USDA 110) и *B. ottawaense* (USDA 4). Группа штаммов USDA 123 – интенсивно растущие ризобии и наиболее часто встречающиеся в почвах регионов культивирования сои [Ham et al., 1971; Madrzak et al, 1995; Godoy et al., 2008]; группы USDA 6 T, USDA 4 [Yu et al., 2014] и USDA 110 [Delamuta et al., 2013] – группы медленнорастущих штаммов (рис. III.8).

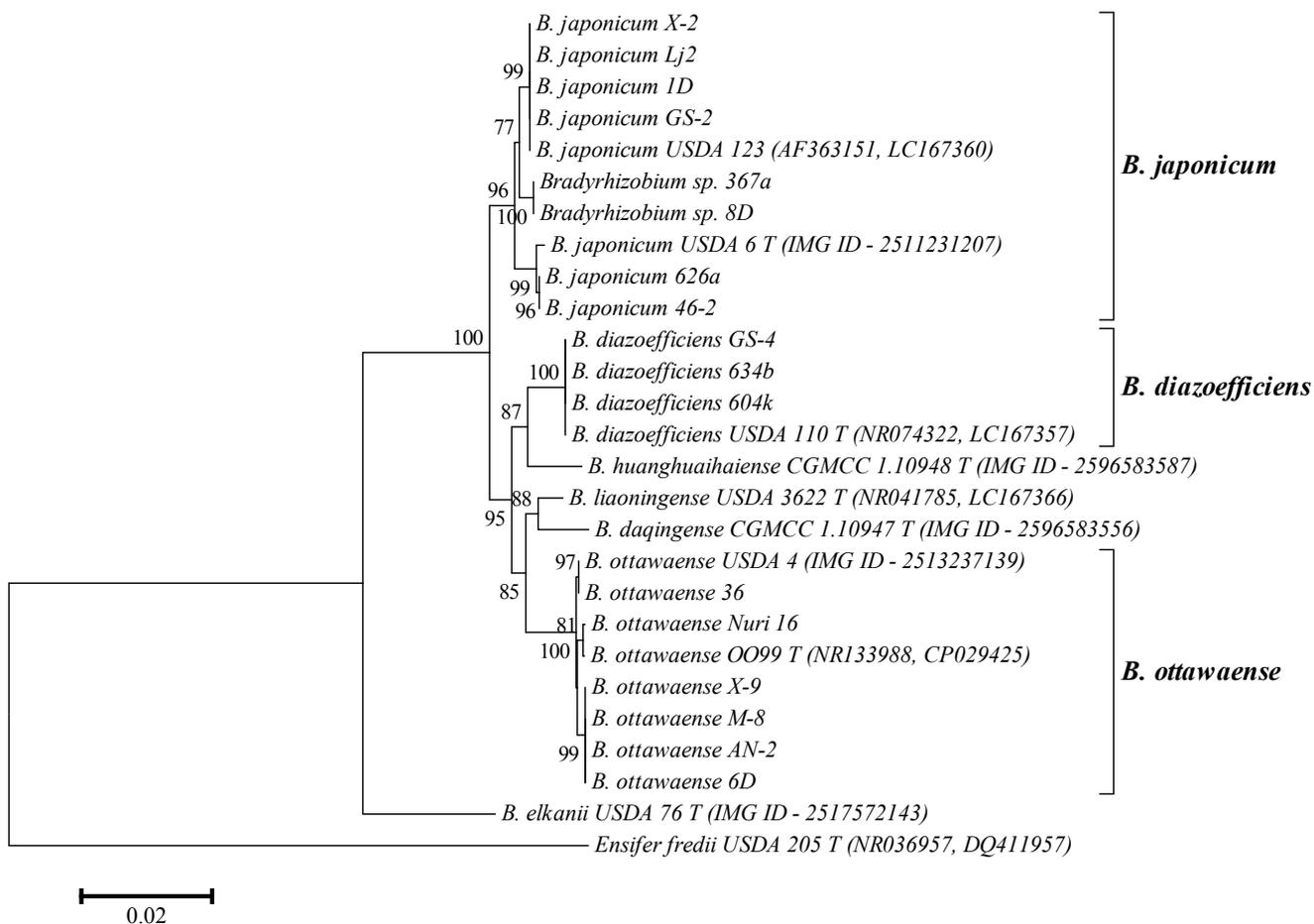


Рисунок III.8. Филогенетическое дерево, построенное на основе совокупных данных сравнительного анализа полных нуклеотидных последовательностей гена *16S* рРНК и фрагмента гена *proV* бактерий рода *Bradyrhizobium* (микросимбионтов сои) с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 2 заменам на 100 пар оснований (генетическим дистанциям). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap» - анализа 1000 реплик. Значения «bootstrap» ниже 70% не показаны.

Для анализа внутривидового полиморфизма было проведено секвенирование межгенного региона 16-23S рРНК (ITS). В результате штаммы вида *B. japonicum* были дифференцированы по группам USDA 123 и USDA 6. При этом 2 изолята из клубеньков люпина и десмодиума образовали референсную группу, а изолят Nuri 16 из клубеньков арахиса попал в группу USDA 4 (*B. ottawaense*) и оказался филогенетически ближе к симбионтам сои (рис. III.9).

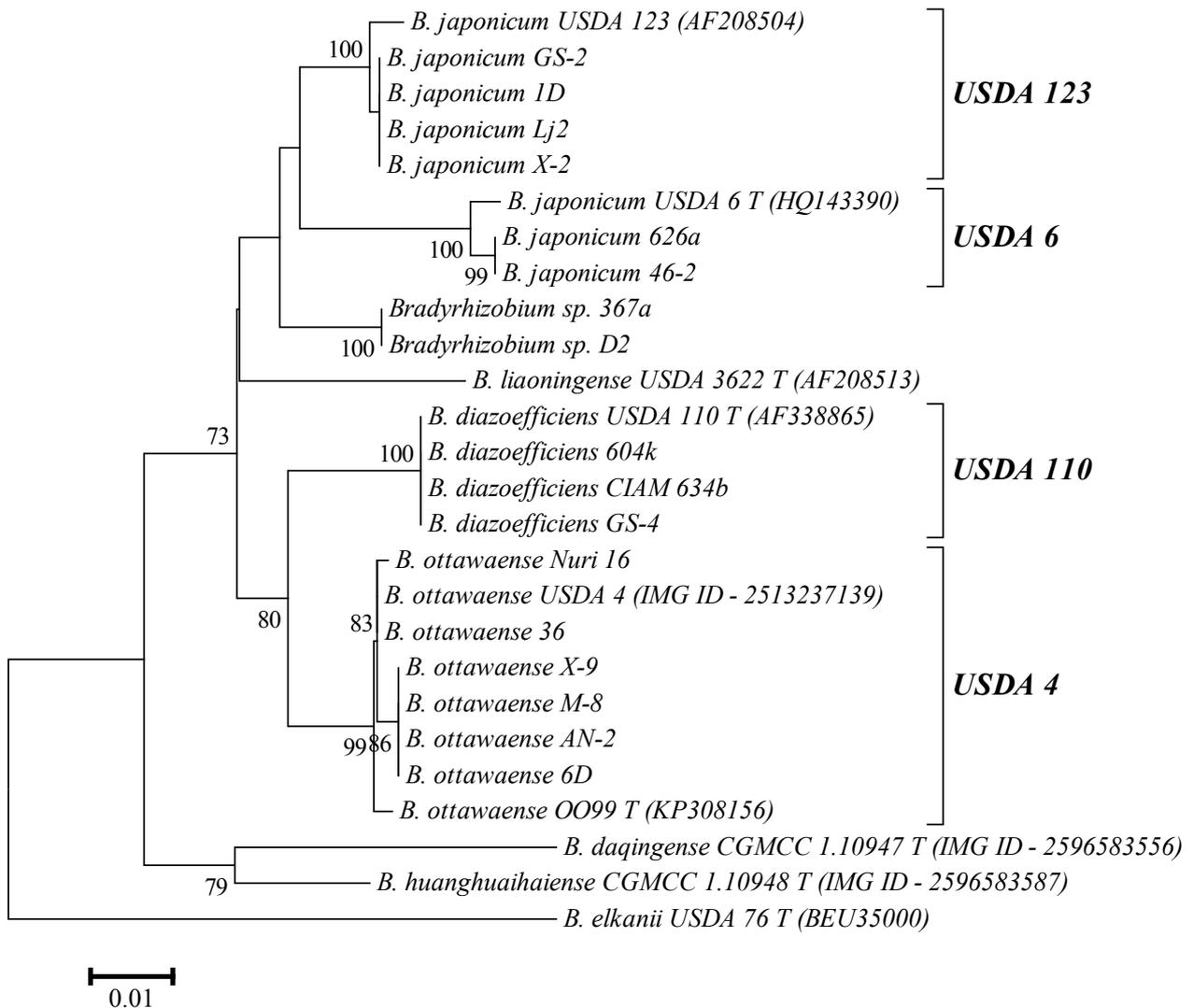


Рисунок III.9. Филогенетическое дерево, построенное на основе данных сравнительного анализа полных нуклеотидных последовательностей межгенного региона 16-23S рРНК (ITS) бактерий рода *Bradyrhizobium* (микросимбионтов сои) с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 1 замене на 100 пар оснований (генетическим дистанциям). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap» - анализа 1000 реплик. Значения «bootstrap» ниже 70% не показаны.

1.3.2. Генетический полиморфизм симбиотических генов *nodC* и *nifH*

На основе совокупных данных сравнительного анализа полных нуклеотидных последовательностей генов *nodC* и *nifH* бактерий рода *Bradyrhizobium* было построено филогенетическое дерево (рис. III.10). Исследуемые микросимбионты сои, вместе с ризобиями десмодиума и люпина, составляют одну группу, предположительно образуя соответствующую ГПИ. Взятый в качестве сравнения арахисовый штамм генетически удален от соевых ризобий по данным маркерам.

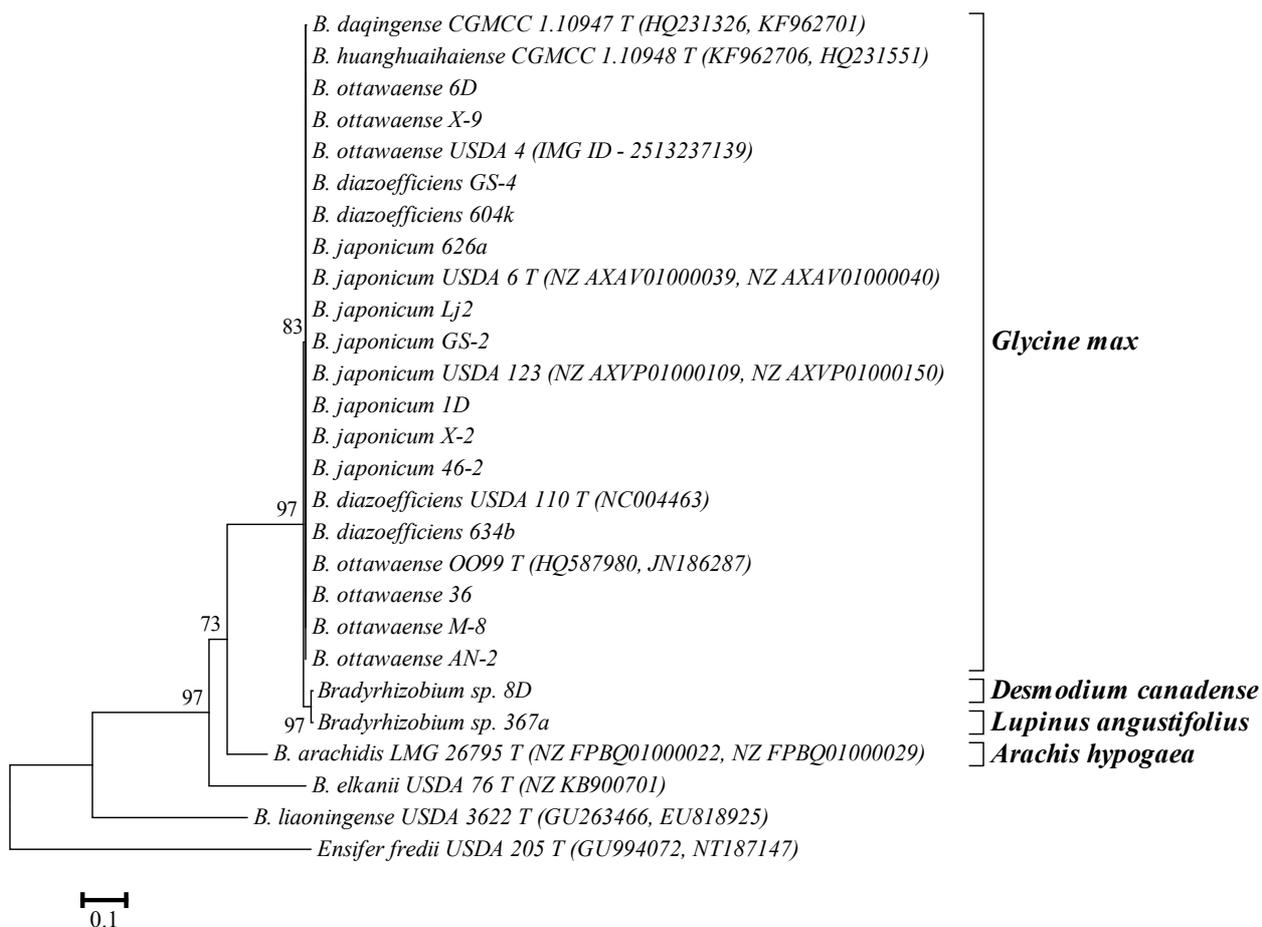


Рисунок III.10. Филогенетическое дерево, построенное на основе совокупных данных сравнительного анализа полных нуклеотидных последовательностей генов *nodC* и *nifH* бактерий рода *Bradyrhizobium* (микросимбионтов сои) с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 1 замене на 10 пар оснований (генетическим дистанциям). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap»-анализа 1000 реплик. Значения «bootstrap» ниже 70% не показаны.

Микросимбионты сои видов *B. daqingense*, *B. huanghuaihaiense*, *B. ottawaense*, *B. diazoefficiens*, *B. japonicum* кластеризуются в одну однородную группу с исследуемыми штаммами. Виды *Bradyrhizobium elkanii* и *Bradyrhizobium liaoningense* генетически удалены и имеют независимую эволюционную историю.

1.3.3. Оценка внутривидового полиморфизма при помощи saAFLP

С помощью метода saAFLP была проведена сравнительная оценка fingerprints штаммов *Bradyrhizobium* sp. на внутривидовом уровне и выявлено 13 генотипов симбионтов сои и 3 генотипа референсных штаммов – симбионтов арахиса, десмодиума и люпина (рис. III.11).

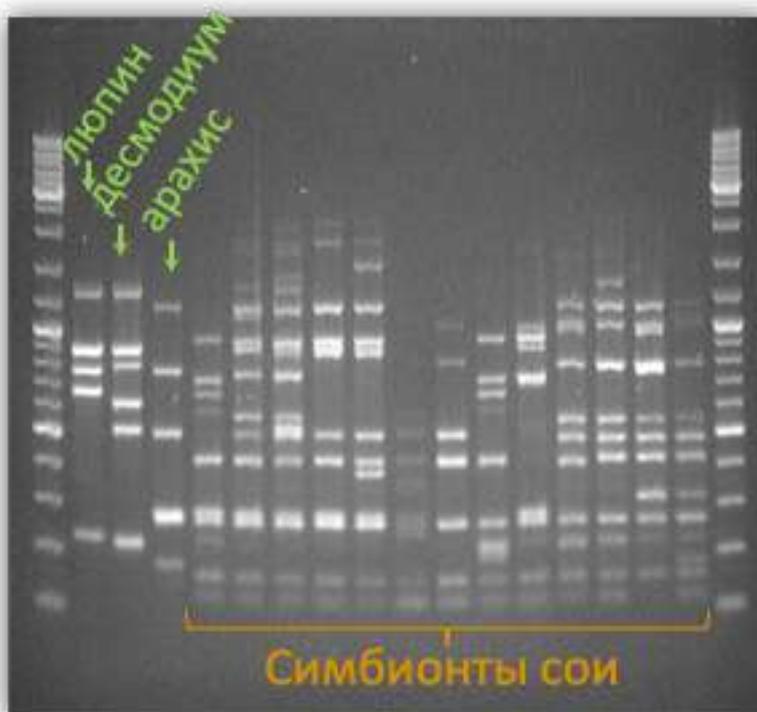


Рисунок III.11. saAFLP анализ с использованием эндонуклеазы рестрикции *Xma*II. Дорожки: Маркер Gene Ruller mix; 1- 367a, 2- 8D, 3- Nuri 16, 4-AN-2, 5- 6D, 6- M-8, 7- X-9, 8- 36, 9- 634b, 10- 604k, 11- USDA 6 T, 12- 46-2, 13- X-2, 14- Lj2, 15- 1D, 16- GS-2; маркер Gene Ruller mix.

Интересно, что симбионт арахиса Nuri 16, отнесенный по результатам мультилокусного секвенирования в группу USDA4, по данным saAFLP оказался также ближе к симбионтам сои (штамму *B.japonicum* USDA 6), нежели к другим референсным штаммам – симбионтам люпина и десмодиума, не имея с последними ни одного общего фрагмента fingerprints saAFLP. Как видно из рисунка III.11, с использованием данной техники удалось выявить штаммовые различия как внутри группы быстрорастущих штаммов, так и между медленнорастущими штаммами.

1.4. Уровень нуклеотидного полиморфизма маркеров ризобий симбионтов фасоли, сои и растений ГПИ трибы *Viciae*

Разрешающая способность молекулярно-генетических методик, применяемых для идентификации и дифференциации микроорганизмов, различается в зависимости от функционала и расположения маркера в геноме. Для дальнейшего анализа генетического полиморфизма были взяты актуальные данные (на сентябрь 2019 г.) нуклеотидных последовательностей соответствующих маркеров из базы данных GenBank NCBI и IMG/MER JGI, а также секвенированные последовательности исследуемой выборки штаммов.

С помощью программного продукта DNAsp 5.10 [Rozas et al., 2010] для клубеньковых бактерий по каждому маркеру было определено нуклеотидное разнообразие (вычисляемое как среднее число нуклеотидных различий на сайт между двумя последовательностями [Nei 1987, Nei, Miller 1990], его дисперсия выборки [Nei, 1987]), и количество полиморфных сайтов (табл. III.5). Также были построены графики, отражающие уровень ДНК-полиморфизма используемых маркеров в «скользящем окне» (рис. III.12, 13).

Таблица III.5. Уровень нуклеотидного полиморфизма маркеров бактерий рода *Rhizobium*.

Генетический маркер	Нуклеотидное разнообразие, P_i	Количество полиморфных сайтов, S
16S рРНК (1317 п.о.)	0,01234	120
<i>rpoB</i> (934 п.о.)	0,06292	312
<i>Sym</i> -гены:		
bv. phaseoli		
<i>nodC</i> (804 п.о.)	0,13566	364
<i>nifH</i> (407 п.о.)	0,04675	97
bv. viciae		
<i>nodD</i> (867 п.о.)	0,03434	96

Были использованы нуклеотидные последовательности хромосомных маркеров, генов 16S рРНК и β -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы (*rpoB*), всех штаммов – микросимбионтов фасоли обыкновенной (37 штаммов), гороха и бобов (34 штамма), а также типовые штаммы различных видов *Rhizobium* sp. (26 штаммов). Известно, что вследствие низкой разрешающей способности, частых рекомбинационных событий и горизонтального переноса, ген 16S рРНК не может быть применен для достоверного определения филогенетической структуры рода *Rhizobium* на видовом уровне [Willems, Collins, 1993; Gaunt et al., 2001; Eardly et al., 2005]. Данный ген более консервативен, что подтверждается низким уровнем нуклеотидного разнообразия. Белок-кодирующий ген *rpoB* характеризуется большим количеством полиморфных сайтов и позволяет разделять штаммы на уровне вида.

Ген *nodC*, наряду с другими генами нодуляции, причислен к «общим генам клубенькообразования». Ввиду того, что симбиотические гены у данных бактерий

локализованы на плазмиде, этот маркер часто используется исследователями для изучения генетики специфичности бобово-ризобияльного симбиоза [Тихонович с соавт., 2009], а наличие у всех видов *Rhizobium* sp. только одной копии гена *nodC* позволяет изучать эволюцию *sym*-плазмид. В рамках проведенных работ, уровень нуклеотидного полиморфизма данного симбиотического маркера у бактерий рода *Rhizobium* sp. (микросимбионтов фасоли, гороха и бобов) выше, чем у хромосомных генов, что соответствует общепризнанной практике использования гена *nodC* в качестве филогенетического маркера симбиоваров бактерий рода *Rhizobium* sp. [Peix et al. 2015].

Нуклеотидные последовательности плазмидных маркеров ризобий, микросимбионтов фасоли и гороха (*nodC*, *nifH* и *nodD*), показали высокий уровень нуклеотидного разнообразия. В случае с фасолью – это подтверждает возможность образования клубеньков на корнях фасоли обыкновенной множеством почвенных бактерий.

Для определения уровня нуклеотидного полиморфизма штаммов – микросимбионтов сои (18 штаммов), а также типовых штаммов рода *Bradyrhizobium* sp. были использованы последовательности хромосомных маркеров: генов 16S рРНК и β -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы (*rpoB*), межгенного региона 16-23S рРНК (ITS) (табл. III.6). Как и для бактерий рода *Rhizobium* sp., последовательности гена 16S рРНК характеризуются наименьшим нуклеотидным разнообразием и количеством полиморфных сайтов.

Таблица III.6. Уровень нуклеотидного полиморфизма маркеров бактерий рода *Bradyrhizobium*.

Генетический маркер	Нуклеотидное разнообразие, Pi	Количество полиморфных сайтов, S
16S рРНК (1444 п.о.)	0,00509	48
<i>rpoB</i> (940 п.о.)	0,03768	131
16-23S рРНК (ITS) (916 п.о.)	0,04364	133
<i>Sym</i> -гены:		
<i>nodC</i> (780 п.о.)	0,03822	287
<i>nifH</i> (702 п.о.)	0,01329	94

Генотипирование выборки микросимбионтов сои на основе хромосомных маркеров *rpoB* и межгенного региона 16-23S рРНК позволило разделить штаммы на уровне вида. Данные маркеры, в рамках MLSA анализа, способствуют более точному определению таксономического положения штамма за счет более высокого уровня нуклеотидного разнообразия по сравнению с «золотым стандартом» - идентификации на основе секвенирования гена 16S рРНК.

Несмотря на высокий уровень полиморфизма симбиотических маркеров бактерий рода *Bradyrhizobium* sp., использование их для дифференциации симбиоваров микросимбионтов сои ограничено. Это обусловлено частыми явлениями горизонтального переноса пула симбиотических генов между генетически удаленными штаммами.

2. Выявление сорт-штаммовой специфичности в условиях лабораторного опыта

2.1. Вегетационные испытания на растениях *Pisum sativum* и *Vicia faba*

Ранее нами были показаны различия в эффективности симбиоза *Pisum sativum* и *Vicia faba* с ризобиями различных генотипов по хромосомному маркеру *hin*-региону, что было обусловлено бобово-ризобиальной специфичностью. На растениях гороха в условиях лабораторного опыта был выявлен различная морфология клубеньков, при котором инокуляция растений штаммами IA-генотипа способствовала образованию нормальных палочковидных клубеньков, а в случае обработки ризобиями IB-генотипа – приводила к появлению “химерных” клубеньков бобово-горохового типа [Kharchaeva et al., 2013] (рис. III.12).

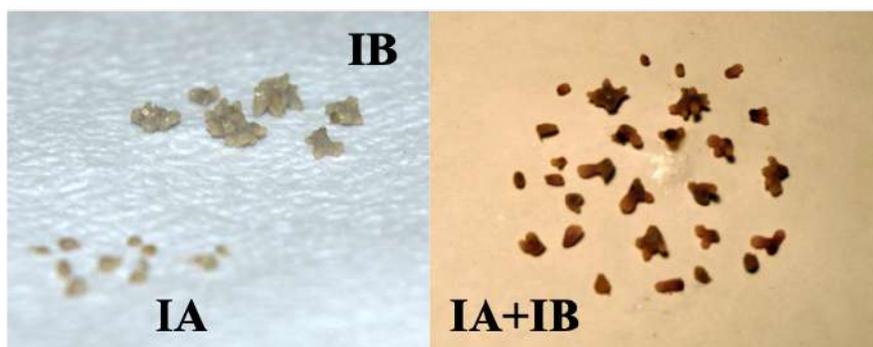


Рисунок III.12. Морфотипы клубеньков, образованных в результате инокуляции различными генотипами ризобий.

Большинство клубеньков, образовавшихся на корнях гороха посевного, были образованы ризобиями IA-генотипа, а на корнях бобов – IB-генотипа. Для проверки выявленной закономерности в стерильных лабораторных условиях нами были спланированы и проведены лабораторные испытания (табл. III.7). Был проведен опыт с инокуляцией семян гороха 9 сортов смесью ризобий с различными генотипами. В качестве инокулятов выступали штаммы, выделенные исходно из клубеньков гороха, бобов и чины. Также были использованы штаммы *Rhizobium leguminosarum* Ls4 (Ia) и Ls8 (HF) с новыми генотипами, характеризующимися наличием делеции в IA-генотипе и вставки в IB-генотип [Харчаева с соавт., 2018]. Интересен тот факт, что два новых *hin*-региона стали детектироваться в случае работы с тотальной ДНК клубеньков, в отличие от работы с генетическим материалом чистых культур ризобий.

Целью проведения данного опыта было выявление генотипа ризобий, наиболее часто встречающихся в клубеньках каждого из сортов гороха. Каждый вариант опыта был представлен в 4-х повторностях (рис. III.13).

Таблица III.7. Схема вегетационного опыта.

Вариант опыта	Состав инокулята / <i>hin</i> -генотип
Положительный контроль, K+	Смесь 5 штаммов <i>R. leguminosarum</i> : B-18 – IB генотип 65 – IA генотип Y-2 – IA генотип Ls4 – Ia генотип Ls8 – HF генотип
Отрицательный контроль, K-	Без микробной обработки



Рис. III.13. Лабораторный опыт на 9 сортах гороха посевного.

Были проанализированы высота и вес наземной части растений, а также проведено генотипирование КЛОЕ в клубеньках. По результатам лабораторного опыта выявлено, что применение предпосевной обработки семян суспензией ризобиальных культур приводит к существенному увеличению высоты ($НСР_{0,5} = 7,89$; фактическая разница значений на сорте Софья меньше, соответственно различия несущественны) и веса наземной части ($НСР_{0,5} = 0,6$) растений по сравнению с вариантом опыта без обработки (рис. III.14).

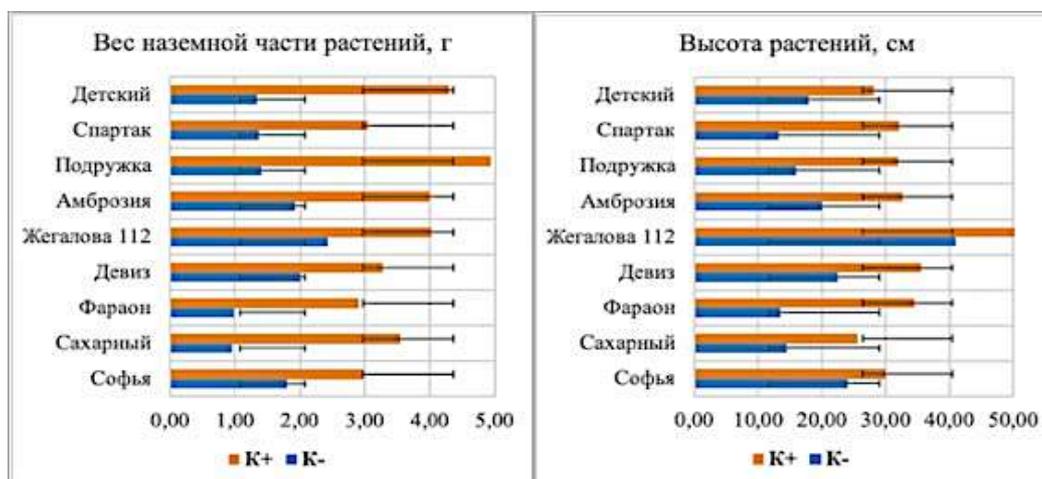


Рисунок III.14. Средние высота и вес наземной части растений гороха 9 сортов по вариантам опыта с указанием стандартного отклонения.

Для последующего генотипирования ризобий, образовавших клубеньки в варианте опыте К+ (в отрицательном контроле клубеньков не обнаружено), для каждого сорта с корней 4-х растений провели сбор активных клубеньков. Для формирования усредненной выборки с каждого вида были отобраны 12 клубеньков. Далее из каждого клубенька была выделена тотальная ДНК.

По результатам *hin*-регион ПЦР все КлОЕ были представлены генотипом, схожим с генотипом HF штамма *R. leguminosarum* Ls8 (1300 п.о.). Ввиду того, что данный генотип не был выявлен ранее, как специфичный при симбиотических взаимодействиях с горохом, а также штамм-инокулят *R. leguminosarum* Ls8 был выделен из клубеньков чины, столь тотальная представленность его в клубеньках на корнях всех 9 сортов гороха вызвала большой интерес к данному штамму. В результате было решено провести полногеномное секвенирование этого штамма с последующим сравнением с гороховым микросимбионтом - *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841, генотип IB [Young et al., 2006], выделенного из клубеньков гороха посевного.

Для описания результатов полногеномного секвенирования штаммов для задач таксономии указаны данные, представленные в таблице III.8. В результате секвенирования и анализа аннотаций было выявлено, что оба штамма имеют сходные значения в структуре генома. Содержание GC-оснований соответствует значениям, представленным для геномов других штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* в базе данных NCBI / Genome.

Таблица III.8. Общие результаты полногеномного секвенирования штамма.

Характеристика	Штаммы <i>Rhizobium leguminosarum</i>	
	<i>R. leguminosarum</i> Ls8	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841
Размер генома, п.о.	7 438 625	7 751 309
Общее число контигов/ scaffolds	90	7 (1 хромосома, 6 плазмид)
GC, %	60	60,86
Количество аннотаций:	7 077	7 357
кодирующие	7 027 (99,29%)	7 276 (99,9%)
тРНК	49 (0,69%)	52 (0,71%)

Основные результаты сравнения структуры межгенного региона, *hin*-маркера, выявили следующие сходства и отличия в геномах исследуемых штаммов (табл. III.9).

Таблица III.9. Сравнительная характеристика *hin*-маркера исследуемых штаммов.

Характеристика	Штаммы <i>Rhizobium leguminosarum</i>	
	<i>R. leguminosarum</i> Ls8	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841
Количество генов тРНК-Глу	3	3
Длина межгенного региона (между тРНК-Глу), п.о.	1 245	254

Наличие кодирующих последовательностей в межгенном регионе/ длина	В	- гипотетический протеин (hypothetical protein)/ 662п.о.	—
---	---	--	---

Для оценки полиморфизма были проанализированы последовательности генов *rhoB* (хромосомный маркер) и *nodD* (симбиотический маркер – ген хозяйской специфичности). С помощью программы BioEdit 7.0.5.2 были получены последовательности указанных маркеров из общего пула контигов. Филогенетические деревья были построены с типовыми штаммами различных видов *Rhizobium*, выделенных из клубеньков с корней гороха и бобов.

При сравнительной оценке нуклеотидных последовательностей симбиотического маркера исследуемый изолят Ls8 оказался наиболее близок к типовому штамму *Rhizobium pisi* DSM 30132 T генотипа *sym-1*, характерного для симбионтов *Pisum sativum* (горох посевной, рис. III.15, А и III.2).

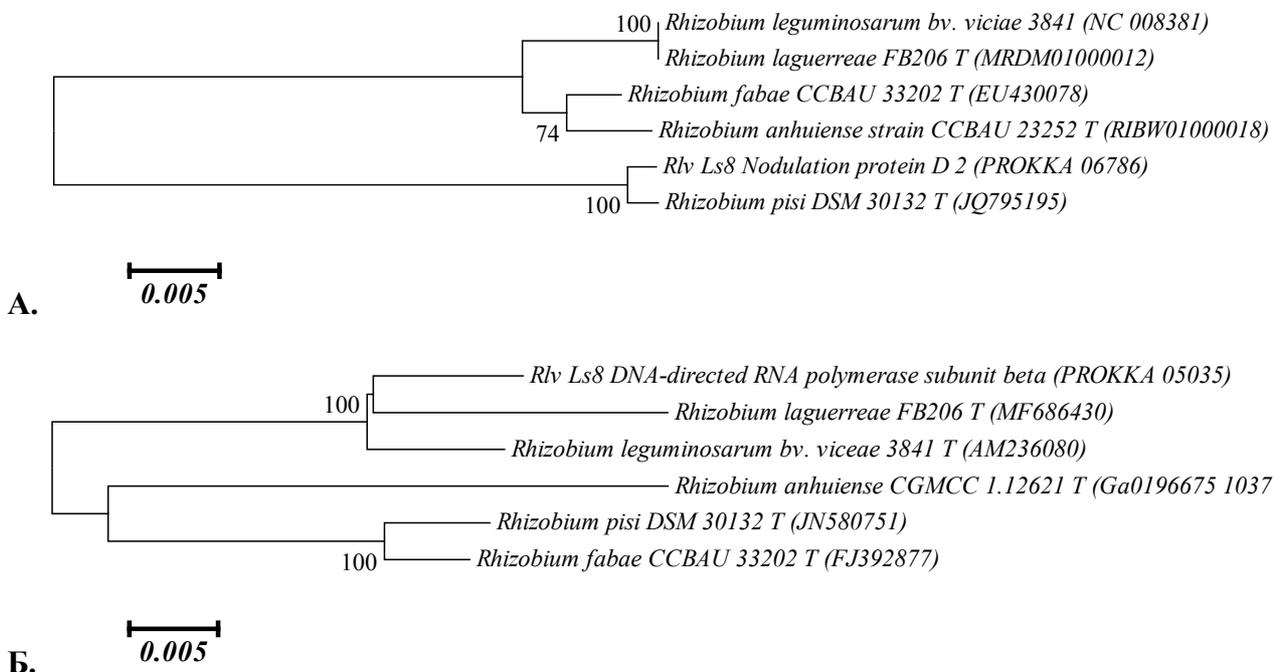


Рисунок III.15. Филогенетические деревья, построенное на основе данных сравнительного анализа полных нуклеотидных последовательностей генов *nodD* (А) и *rhoB* (Б) бактерий рода *Rhizobium* (симбионтов растений ГПИ трибы *Viciae*) с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 5 заменам на 1000 пар оснований (генетическим дистанциям). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap» - анализа 1000 реплик. Значения «bootstrap» ниже 70% не показаны.

По результатам сравнительной оценки нуклеотидных последовательностей хромосомного маркера *rhoB* изолят Ls8 образует монофилетичную группу вместе с типовым штаммом *R. laguerreae* FB206 T и *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (рис. III.19, Б).

2.2. Вегетационные испытания на *Phaseolus vulgaris* (фасоль обыкновенная)

В рамках вегетационных испытаний был проведен лабораторный опыт на фасоли обыкновенной следующих сортов и сортообразцов: 09-180; 09-147; 08-543; 05-82; Шоколадница; Стрела; Пинто (рис. III.16).



Рис. III.16. Лабораторный опыт на фасоли в условиях фитотрона.

В качестве инокулята были использованы суспензии монокультур ризобияльных штаммов, а также смесь всех штаммов в качестве положительного контроля (табл. III.10). Опыт проводили в стерильном вермикулите в 3-х повторностях на вариант опыта, объем вносимого на 1 семя инокулята – 50 мкл с титром клеток 10^8 КОЕ/мл. Источником микроэлементов являлась внесенная по вегетации среда Прянишникова.

Таблица III.10. Схема лабораторного опыта на фасоли различных сортов.

Вариант опыта	<i>hin</i> -генотип штамма-инокулята	<i>rpoB</i> -RFLP профиль штамма-инокулята
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> FA-4	<i>R. leguminosarum</i> I/A	1
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> FK-6	<i>R. leguminosarum</i> I/b	1
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> 105	<i>R. leguminosarum</i> II/C	4
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> FN-6	<i>R. leguminosarum</i> III/d	1
<i>P. giardinii</i> Pv22e	<i>P. giardinii</i>	2
<i>R. phaseoli</i> B-9623	<i>R. phaseoli</i>	3
Положительный контроль – К+	смесь штаммов всех генотипов	
Отрицательный контроль – К-	без микробной обработки	

В результате проведенного опыта на корнях растений в варианте без обработки клубеньков не наблюдалось. В вариантах с моноинокуляцией и инокуляцией смесью штаммов было образовано разное количество клубеньков (табл. III.11). Следовательно, все штаммы, используемые в опыте, обладают нодулирующей способностью (Nod+) по отношению к исследуемым сортам фасоли.

Таблица III.11. Результаты анализа лабораторного опыта с инокуляцией микробной суспензией семян фасоли различных сортов.

Сорт/сортообразец	Вариант обработки	Вес наземной части*, г X±SE	Количество клубеньков, шт.
Стрела	FA-4	0,81±0,06	15
	FK-6	1,34±0,06	40
	105	0,95±0,05	17
	FN-6	3,48±0,03	92
	Pv22e	1,48±0,09	70
	B-9623	1,39±0,04	52
	K+	2,49±0,04	163
	K-	1,05±0,06	0
	HCP ₀₅	0,25	
Пинто	FA-4	1,84±0,06	48
	FK-6	1,69±0,12	40
	105	1,05±0,06	12
	FN-6	1,69±0,15	32
	Pv22e	4,25±0,07	17
	B-9623	1,59±0,13	71
	K+	3,94±0,08	159
	K-	2,17±0,09	0
	HCP ₀₅	0,21	
Шоколадница	FA-4	1,23±0,03	20
	FK-6	1,61±1,56	0*
	105	1,09±0,68	43
	FN-6	1,42±0,50	53
	Pv22e	1,20±0,27	0
	B-9623	1,29±0,54	38
	K+	2,28±0,51	128
	K-	1,18±0,64	35
	HCP ₀₅	1,06	
05-82	FA-4	1,23±0,24	0*
	FK-6	0,97±0,68	32
	105	2,82±0,03	54
	FN-6	3,74±0,03	56
	Pv22e	1,16±0,48	0*
	B-9623	2,08±0,29	0*
	K+	3,27±0,28	65
	K-	1,81±0,49	0
	HCP ₀₅	0,43	
08-543	FA-4	3,57±0,99	26
	FK-6	1,42±0,27	0*
	105	3,91±0,21	135
	FN-6	-	-
	Pv22e	2,56±0,53	65
	B-9623	1,19±0,19	0*
	K+	4,56±0,85	76
	K-	1,68±0,15	0*
	HCP ₀₅	0,82	

09-147	FA-4	1,38±0,57	87
	FK-6	2,24±1,24	0*
	105	1,59±1,03	0*
	FN-6	1,52±0,70	31
	Pv22e	1,79±0,16	0*
	B-9623	1,12±0,78	139
	K+	3,57±0,48	135
	K-	1,83±1,29	0
НСР ₀₅		0,91	
09-180	FA-4	1,58±0,31	10
	FK-6	1,00±0,47	17
	105	1,63±0,38	13
	FN-6	1,77±0,02	26
	Pv22e	1,58±0,73	0*
	B-9623	1,85±0,14	13
	K+	2,33±0,26	49
	K-	2,06±0,06	0
НСР ₀₅		0,58	

Примечание: * - на корнях растений были образованы маленькие клубеньки; в анализ взяты не были.

Как видно из таблицы III.11, ряд штаммов (генотипов) приводили к существенному уменьшению массы надземной части растений (выделено красным); обработка некоторыми штаммами была нейтральной по влиянию на данный показатель; но были и те штаммы (генотипы), которые оказывали явно выраженный эффект на прирост зелёной массы, что свидетельствует о сорт-штаммовой специфичности данных растительно-микробных взаимодействий. Исходя из значения НСР_{0,5} для каждого сорта, различия между вариантами существенны.

Практически на всех исследуемых сортах вариант опыта К+ показал максимальные значения по количеству образовавшихся клубеньков и по массе наземной части растений, проявляя тем самым синергетический эффект, что является косвенным признаком эффективности симбиоза. Сортообразцы 05-82, 08-543, 09-147, 09-180 оказались менее отзывчивыми на инокуляцию, в случае с моноинокуляцией некоторыми из используемых штаммов клубеньков образовано не было.

В случае с положительным контролем на всех сортах было выявлено отличие в морфотипе образовавшихся клубеньков: большие, коричневые «активные» клубеньки и маленькие, зеленые «неактивные» клубеньки (рис. III.17). Последующее генотипирование КлОЕ проводили с учетом этих отличий. С каждого сорта с 3-х растений варианта опыта К+ были собраны клубеньки и сформирована усредненная выборка для последующего генотипирования.



Рисунок III.17. Фотография корней фасоли сортотипа 09-180 в варианте опыта с положительным контролем.

Были отобраны по 6 коричневых и 6 зеленых клубеньков. Идентификацию штамма, образовавшего каждый из клубеньков, проводили с помощью *hin*-регион ПЦР и *rpoB*-RFLP анализа. Как видно из диаграммы (рис. III.18), зеленые клубеньки образованы *hin*-генотипами *P. giardinii* и *R. leguminosarum* IID (2 группа по *rpoB*-RFLP), а коричневые – *R. leguminosarum* IA и *R. phaseoli* генотипами (1 и 3 группы по *rpoB*-RFLP), что в свою очередь подтверждает ранее полученные данные об преобладании IA-генотипа в активных клубеньках на корнях фасоли как в лабораторном, так и в полевом опытах. Образование «неактивных» зеленых клубеньков штаммами ризобий с генотипом *P. giardinii*, аналогичным *hin*-генотипу *P. giardinii*, также подтверждают данные о том, что этот вид изначально описан, как не эффективный на *Phaseolus vulgaris* [Amarger et al., 1997]. Распределение *hin*-генотипов и *rpoB*-RFLP профилей КлОЕ представлено на рисунках III.19, 20.

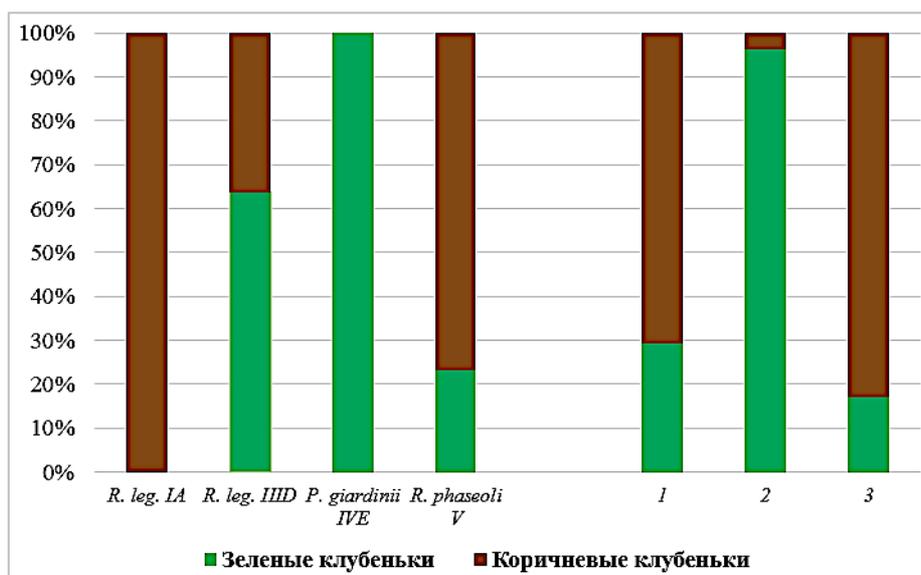


Рис. III.18. Распределение *hin*-генотипов и *rpoB*-RFLP профилей симбионтов фасоли в соответствии с морфотипом клубеньков в опыте К+.

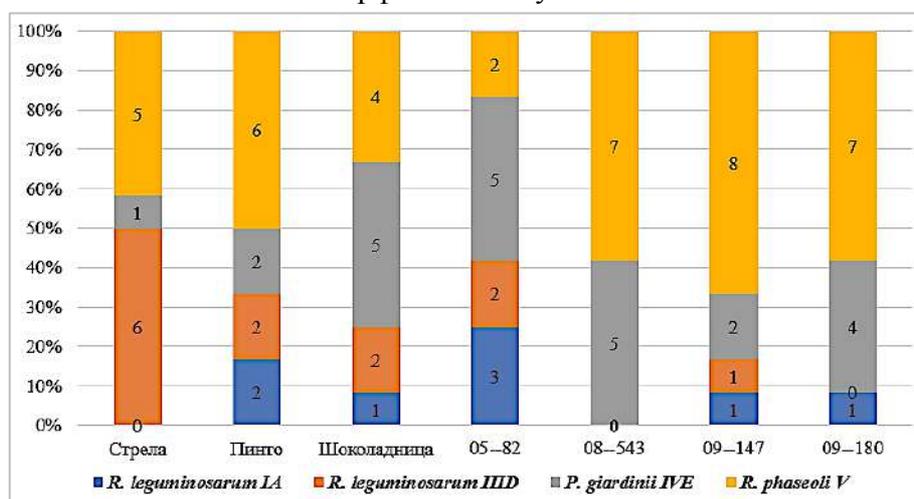


Рис. III.19. Распределение *hin*-генотипов КЛОЕ у разных сортов фасоли. Выборка -12 клубеньков, цифрами обозначено число КЛОЕ каждого из генотипов.

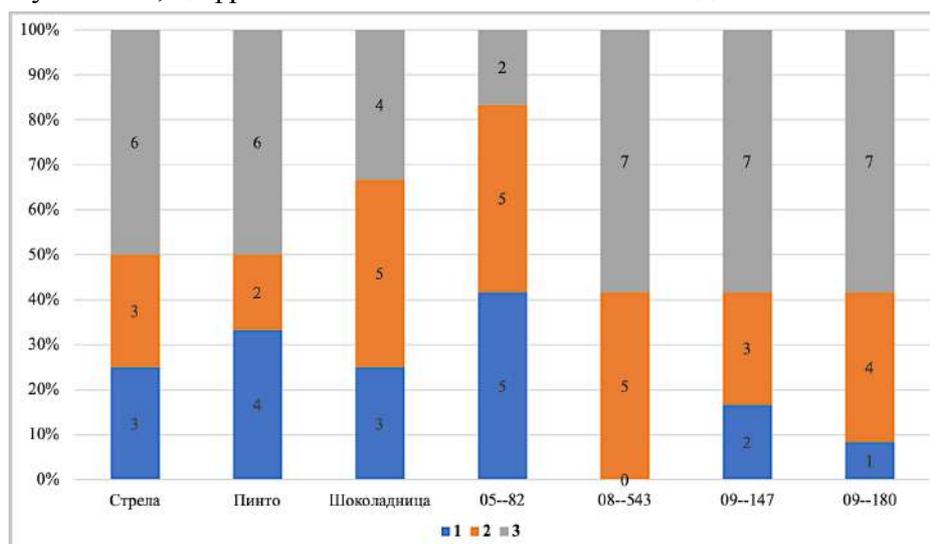


Рис. III.20. Распределение *rpoB*-RFLP профилей КЛОЕ у разных сортов фасоли. Выборка -12 клубеньков, цифрами обозначено число КЛОЕ каждого из профилей.

На основе вышеизложенных диаграмм можно сделать вывод о возможной сортоспецифичности бобово-ризобиальных взаимодействий и выявлении конкретного генотипа, образовавшего большинство клубеньков на корнях растений каждого сорта. А именно, генотип *R. phaseoli* на сорте Стрела, Пинто, сортообразцах 08-543, 09-147, 09-180. Соответствующий данному генотипу *rpoB*-RFLP профиль преобладал в образовавшихся клубеньках. Также есть сорта фасоли, в клубеньках которой вообще не встречаются определенные генотипы ризобий. Например, в клубеньках фасоли Стрела отсутствует КЛОЕ генотипа IA, а в клубеньках сортообразца 08-543 – IA и IID (рис. III.19, III.20).

2.3. Вегетационные испытания на сое (*Glycine max*)

В рамках лабораторного опыта были проведены испытания на 4 сортах сои (Магева, Чера-1, MON-23, Semu 315) согласно следующей схеме (табл. III.12, рис. III.21).

Таблица III.12. Схема лабораторного опыта на различных сортах сои.

Вариант опыта	Состав инокулята	Группа USDA
1	<i>B. diazoefficiens</i> GS-4	USDA 110
2	<i>B. ottawaense</i> M-8	USDA 4
3	<i>B. japonicum</i> 46-2	USDA 6
4	Положительный контроль (К+) – совместная инокуляция штаммами <i>B. diazoefficiens</i> ГС-4, 46-2, М-8.	-
5	Отрицательный контроль (К-), без обработки	-



Рисунок III.21 лабораторный опыт на сое в условиях фитотрона.

При анализе веса наземной части растений было выявлено, что растения сорта MON-23 и Чера-1 не отличались по данному признаку при разной микробной обработке (фактическая разница между значениями меньше значений НСР_{0,5} для каждого сорта). Растения сорта Semu-315 набрали больше зеленой массы при совместной инокуляции тремя штаммами в варианте

опыта K+, а сорт Магева – при инокуляции штаммом GS-4 (USDA 110) и штаммами в варианте опыта K+ (рис. III.22).

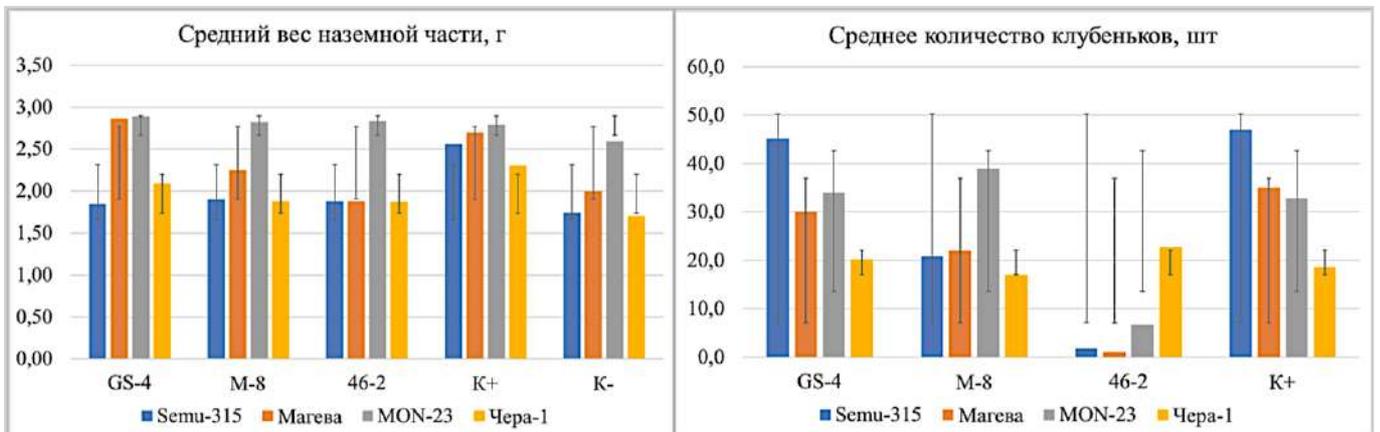
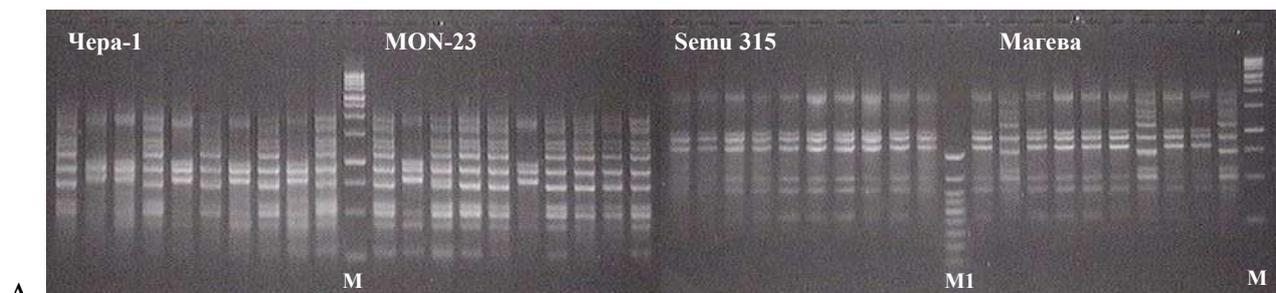


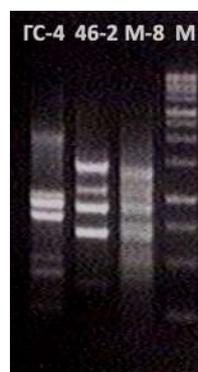
Рисунок III.22. Средние вес наземной части и количество клубеньков на корнях растений сои 4 сортов по вариантам опыта с указанием стандартного отклонения.

По количеству клубеньков откликнулись на инокуляцию смесью штаммов растения сортов Semu-315 и Магева; на корнях растений сорта MON-23 было выявлено большее количество клубеньков при обработке штаммом M-8 (USDA 4); растения сорта Чера-1 не показали статистически различимых значений по данному показателю.

С растений каждого сорта в варианте опыта K+ были отобраны по 10 клубеньков для дальнейшего генотипирования и определения штаммов ризобий, образовавших клубеньки. На выделенной тотальной ДНК клубенька была проведена saAFLP с применением эндонуклеазы рестрикции XmaI (рис. III.23_А).



А.



Б.

Рисунок III.23. Электрофоретическое разделение продуктов реакции saAFLP (XmaI): А. 10 КЛОЕ с 4-х сортов сои; Б. штаммы-инокуляты.

При сравнении полученных профилей с профилями штаммов-инокулятов, представленных на рис. III.23_Б, было выявлено, что клубеньки образованы штаммами GS-4 и М-8 с различным процентным соотношением:

- штаммом GS-4 были образованы все клубеньки на растениях сорта Semu-315 и 70% клубеньков на растениях сорта Магева; данный штамм присутствовал и в клубеньках двух других сортов, но в меньшинстве;
- штаммом М-8 образовано 80% клубеньков на растениях сорта MON-23 и 50 % на растениях сорта Чера-1.

Из вышесказанного можно сделать предположение о выявленной сортовой специфичности, а именно у сортов Semu-315 и Магева к штаммам группы USDA 110, а также у сорта MON-23 к штаммам группы USDA 4.

3. Изучение эффективности действия и стабильности состава консорциумов полезных микроорганизмов (во времени)

В 2008 г Л.В. Трефилова представила диссертационную работу, показывающую перспективность и эффективность использования цианобактерий в агробиотехнологии. Дидович С.В. с соавт. в ходе многолетних экспериментов было установлено, что применение цианобактериальных ассоциаций (ЦБА) способствует максимальной реализации потенциала растительно-микробного взаимодействия в агроценозах, повышая биологическую активность в почве, урожайность зернобобовых культур, улучшая качество зерна [Дидович с соавт., 2016].

Для анализа влияния микроводорослей на функционал и стабильность монокомпонентного биопрепарата на основе эффективных ризобийных штаммов был спланирован вегетационный опыт с использованием микроводорослей *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (коллекция кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова) и *Nostoc linckia* CCM 144 (ACSSI 271 – Альгологическая коллекция ИФХиБПП РАН – Algal Collection of Soil Science Institute (ACSSI)).

В рамках вегетационного опыта семена фасоли сорта «Стрела» были обработаны различными микробными препаратами в 3-х повторностях с разным временем хранения согласно схеме опыта (табл. III.13). Инокуляты хранили в темном и сухом месте в микроцентрифужных полипропиленовых пробирках объемом 1,5 мл. Через 3 недели после посадки проводилась оценка количества образованных на корнях клубеньков и распределения *hin*-генотипов КлОЕ.

Таблица III.13. Схема вегетационного опыта на фасоли сорта «Стрела».

Вариант опыта	Инокулят
Отрицательный контроль (К-)	Без обработки
Положительный контроль (К+)	<i>R. leguminosarum</i> (FA-4; 105); <i>P. giardinii</i> Pv8e
Водорослевый биопрепарат №1 - ЦБК	<i>Nostoc linckia</i> CCM 144 + <i>R. leguminosarum</i> (FA-4; 105); <i>P. giardinii</i> Pv8e
Водорослевый биопрепарат №2 - хлорелла	<i>Chlorella vulgaris</i> IPPAS C-1 + <i>R. leguminosarum</i> (FA-4; 105); <i>P. giardinii</i> Pv8e

Анализ проводился последовательно по достижении пяти временных точек от начала эксперимента:

1 ВТ (23 апреля 2018 г) – 0 дн.;

2 ВТ (24 мая 2018 г) – 30 дн.;

3 ВТ (04 июня 2018 г) – 45 дн.;

4 ВТ (24 июля 2018 г) – 90 дн.;

5 ВТ (19 октября 2018 г) – 180 дн.

В результате по физиологическим параметрам растений фасоли было выявлено, что функциональная активность (удельное количество клубеньков) исследуемых инокулятов в

течение первых 30 дней хранения стабильна либо повышается; после 45 дней и до 180 дней – падает; а по истечении полугода восстанавливается (рис. III.24).

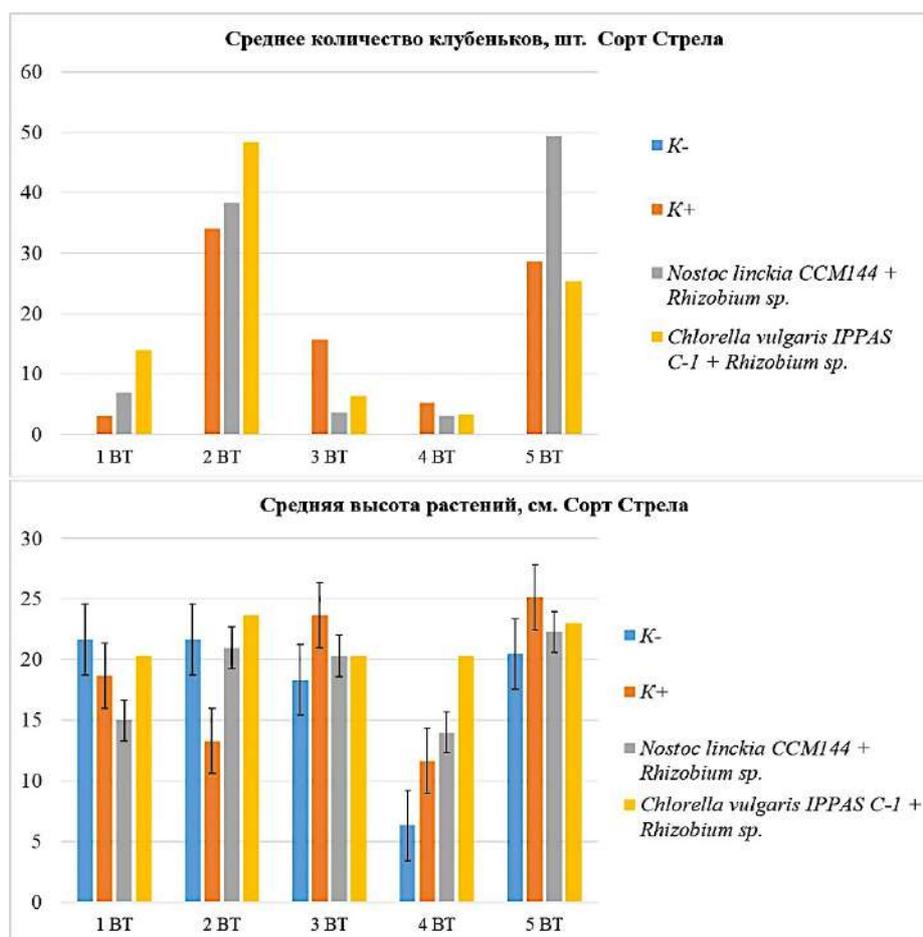


Рисунок III.24. Результаты проведенного вегетационного испытания на фасоли сорта «Стрела».

Определение генотипа КЛОЕ проводили с помощью *hin*-регион ПЦР. Из 10 клубеньков в каждом варианте опыта и временной точке была выделена тотальная ДНК. В результате выявлено, что клубеньки были образованы генотипами штаммов FA-4 (*R. leguminosarum* IA) и Pv8e (*P. giardinii*).

Таблица III.14. Изменение генотипа ризобий в составе биопрепарата в процессе хранения.

Вариант опыта	Генотип	1BT	2BT	3BT	4BT	5BT
Положительный контроль (K+)	<i>R. leg. IA</i>	100%	100%	90%	40%	90%
	<i>P. giardinii</i>	-	-	10%	60%	10%
Водорослевый биопрепарат №1 - ЦБК	<i>R. leg. IA</i>	100%	100%	10%	65%	-
	<i>P. giardinii</i>	-	-	90%	35%	100%
Водорослевый биопрепарат №2 - хлорелла	<i>R. leg. IA</i>	100%	10%	40%	80%	-
	<i>P. giardinii</i>	-	90%	60%	20%	100%

Как видно из таблицы III.14, водорослевые биопрепараты приводят к изменению генотипа ризобий, образовавших большинство клубеньков, по сравнению с положительным контролем. Предположительно это может быть связано с присутствием различных бактериальных спутников у микроводорослевых ассоциаций, что может смещать микробное равновесие.

Для оценки качественного соотношения таксонов в водорослевых биопрепаратах для каждой временной точки инокуляты подвергались метагеномному секвенированию по хромосомному маркеру 16S рРНК.

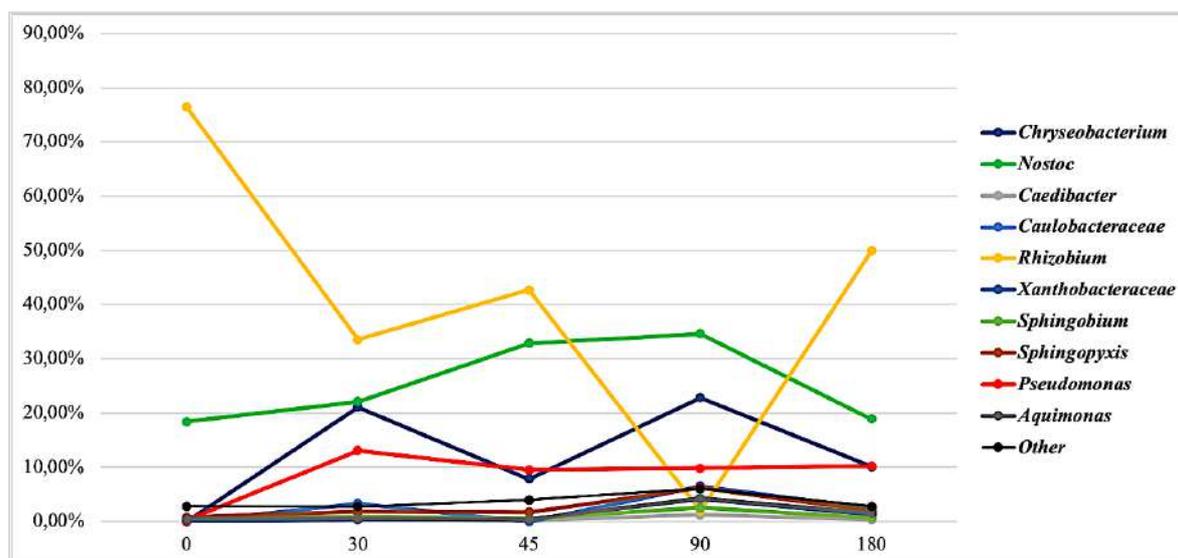


Рис. III.25. Компонентный состав комплексного микробного биопрепарата на основе *Nostoc linckia* ССМ 144 в процессе хранения (6 мес.).

По результатам метагеномного секвенирования было выявлено, что к 30 дн хранения препарата на основе *Nostoc linckia* ССМ 144 количество бактерий рода *Rhizobium* сократилось вдвое. Однако именно после инокуляции растений биопрепаратом с данным сроком хранения было получено заметное увеличение количества клубеньков (рис. III.25). К 30 дн хранения возрастает количество бактерий рода *Pseudomonas* и семейства *Xanthobacteraceae*, который включает род *Azorhizobium*. Содержание цианобактерии *Nostoc* к 90дн хранения увеличивается примерно в 2 раза, а содержание ризобий падает до 0, соответственно, при инокуляции растений биопрепаратами со сроком хранения 3 мес. клубеньков практически не образовалось. Интересно, что уменьшение содержания ризобий на 30 дн и 90 дн хранения коррелирует с увеличением количества ДНК-матриц бактерий семейства *Xanthobacteraceae*. К 6 мес. хранения соотношение бактериальных таксонов в биопрепарате на основе *Nostoc linckia* ССМ 144 отличалось от первоначального состава наличием бактерий рода *Pseudomonas* (10%) и семейства *Xanthobacteraceae* (10%), доля ризобий уменьшилась до 50%; доля цианобактерий *Nostoc* осталась такой же.

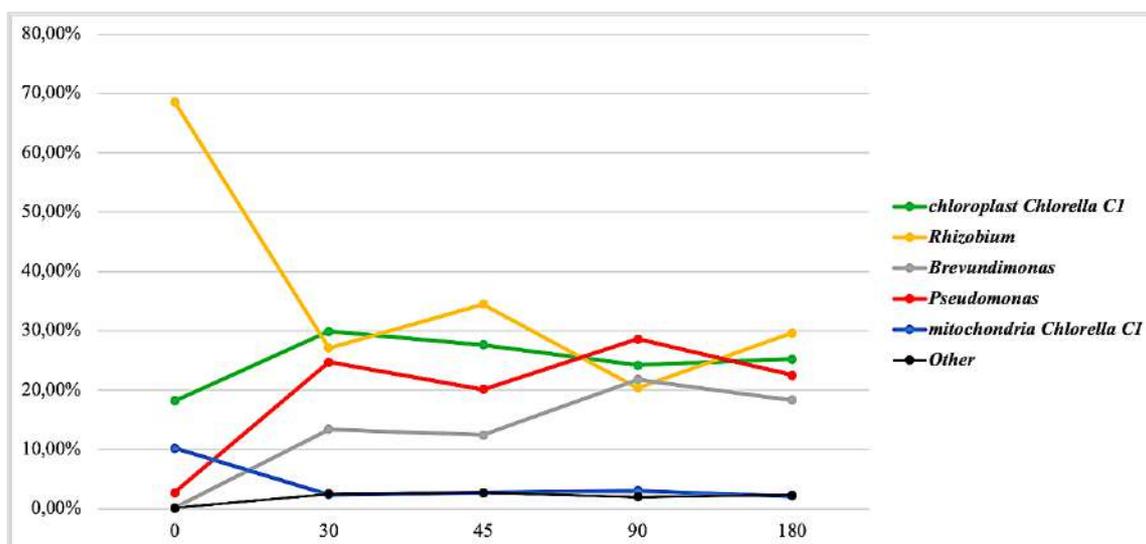


Рис. III.26. Компонентный состав комплексного микробного биопрепарата на основе *Chlorella vulgaris* C1 в процессе хранения (6 мес.).

У биопрепарата на основе *Chlorella vulgaris* после 30 дней хранения также резко уменьшается доля бактерий рода *Rhizobium*, а доля *Chlorella*, *Pseudomonas* и *Brevundimonas* возрастает (рис. III.26). Интересно, что к 3 мес. хранения происходит стабилизация состава биопрепарата, и доля всех основных выявленных таксонов колеблется между 20-30%. Также выявлена корреляция между падением числа ризобияльных матриц и ростом числа матриц бактерий *Pseudomonas* на 30дн и 90дн хранения биопрепарата.

4. Проверка эффективности азотфиксирующего симбиоза в условиях полевого опыта

4.1. Специфичность симбиотических взаимодействий бактерий рода *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* с растениями трибы *Viciae*

Также были проведены полевые испытания на растениях группы перекрестной инокуляции (ГПИ). В рамках опыта семена гороха, бобов, чины и чечевицы перед посадкой были инокулированы смесью производственных штаммов с различной комбинацией хромосомных и симбиотических генотипов. Дальнейшее генотипирование КлОЕ проводили путем выделения тотальной ДНК клубенька с последующим выявлением генетического полиморфизма на основе анализа последовательностей хромосомных маркеров ризобий (фрагмента гена *rhoB* и *hin*-региона) и рестрикционного анализа плазмидного маркера – фрагмента гена ризобияльного симбиотического транскрипционного регулятора - *nodD*.

В рамках данного полевого испытания в качестве инокулятов были использованы производственные штаммы с 4 различными комбинациями генотипов. Исходно эти штаммы выделены из активных клубеньков гороха (*Pisum sativum* L.) и бобов (*Vicia faba* L.) и идентифицированы как *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (табл. III.15).

Таблица III.15. Производственные штаммы клубеньковых бактерий, входящих в состав инокулята для предпосевной обработки семян.

Штаммы	Растение-хозяин	<i>hin</i> -генотип	<i>rpoB</i> -генотип	<i>sym</i> -генотип
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Y-2	<i>Pisum sativum</i>	Ia	1	<i>sym</i> -4
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Y-7		IB	2	<i>sym</i> -1
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 65		IA	1	<i>sym</i> -1
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> B-25	<i>Vicia faba</i>	IB	2	<i>sym</i> -4

Семена бобовых растений ГПИ: гороха (сорт Девиз), чечевицы (сорт Линза), чины (сорт Сподиванка) и кормовых бобов (сорт Билун) перед посевом обрабатывали суспензией 3-суточных культур штаммов *Rlv* Y-2, Y-7, 65 и B-25, смешанных в равных пропорциях из расчета инокуляционной нагрузки – 10^6 бактерий / семя, в объеме – 2% инокулята от массы семян. Полевой опыт с совместным посевом семян гороха, кормовых бобов, чины, чечевицы проводили в 2016 г. на площади опытного участка (10 м²) на дерново-подзолистых почвах с пахотным горизонтом 20 см (Московская область, Россия). Ранее на данном участке бобовые культуры не выращивались, предшественником являлись томаты. Через 7 недель, когда все растения вошли в фазу цветения, с 10 растений каждого вида проводили сбор активных клубеньков. Для формирования усредненной выборки с каждого вида были отобраны по 24 клубенька и трехкратно отмыты от почвы в стерильной воде. Клубеньки не стерилизовали, т.к. оценка ДНК КлОЕ проводилась, минуя стадию выделения изолятов ризобий в чистую культуру. Далее из каждого клубенька была выделена тотальная ДНК.

В ранее проведенных лабораторных испытаниях при совместной инокуляции семян гороха и бобов смесью данных штаммов в преобладающем большинстве клубеньков были обнаружены штаммы со специфичной к растению-хозяину комбинацией маркеров, а именно: для гороха - IA / *sym*-1, для бобов - IB / *sym*-4 [Kharчаeva, 2013]. В рамках настоящего полевого испытания планировалось оценить нодуляционную конкурентоспособность производственных штаммов на фоне аборигенных клубеньковых бактерий, а также проанализировать распределение генотипов КлОЕ у 4 видов растений.

Анализ тотальной ДНК клубеньков с амплификацией и секвенированием фрагмента маркерного гена *rpoB* показал наличие представителей *Rhizobium leguminosarum* во всех 96 клубеньках. Было выявлено 14 *rpoB*-генотипов КлОЕ, к двум из которых принадлежали штаммы-инокуляты: genotype 1 и genotype 2 (Рис. III.27).

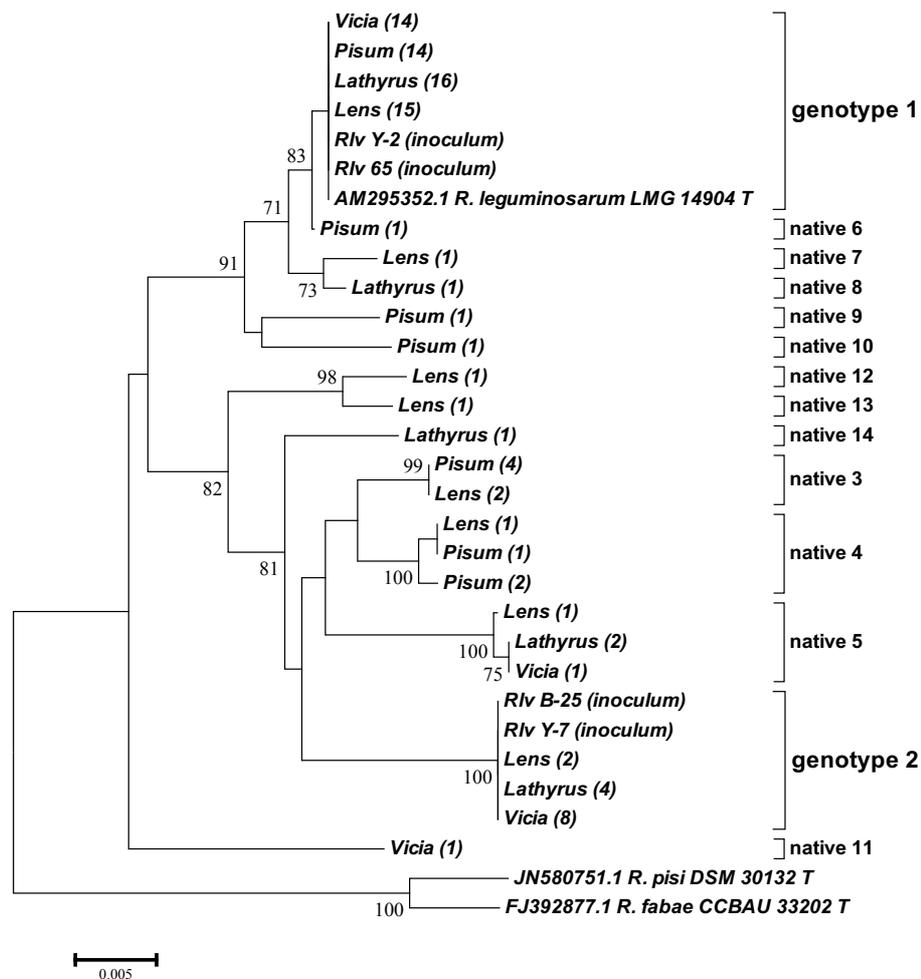


Рисунок III.27. Филогенетическое дерево, построенное на основе данных сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *rpoB* бактерий рода *Rhizobium* – симбионтов растений ГПИ с использованием алгоритма NJ. В скобках указано число КЛОЕ данного генотипа, выявленных в клубеньках гороха (*Pisum*), чечевицы (*Lens*), чины (*Lathyrus*) и кормовых бобов (*Vicia*). Масштаб соответствует 5 заменам на 1000 пар оснований. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap»-анализа 1000 реплик. Значения «bootstrap» ниже 70% не показаны.

Для определения *sym*-генотипа был использован метод рестриционного анализа *nodD*-гена с применением *MspI*-рестриктазы. По результатам электрофоретического разделения продуктов рестрикции для всех четырех растений группы перекрестной инокуляции было выявлено 4 *sym*-генотипа и получено распределение их среди 96 КЛОЕ (рис. III.28).

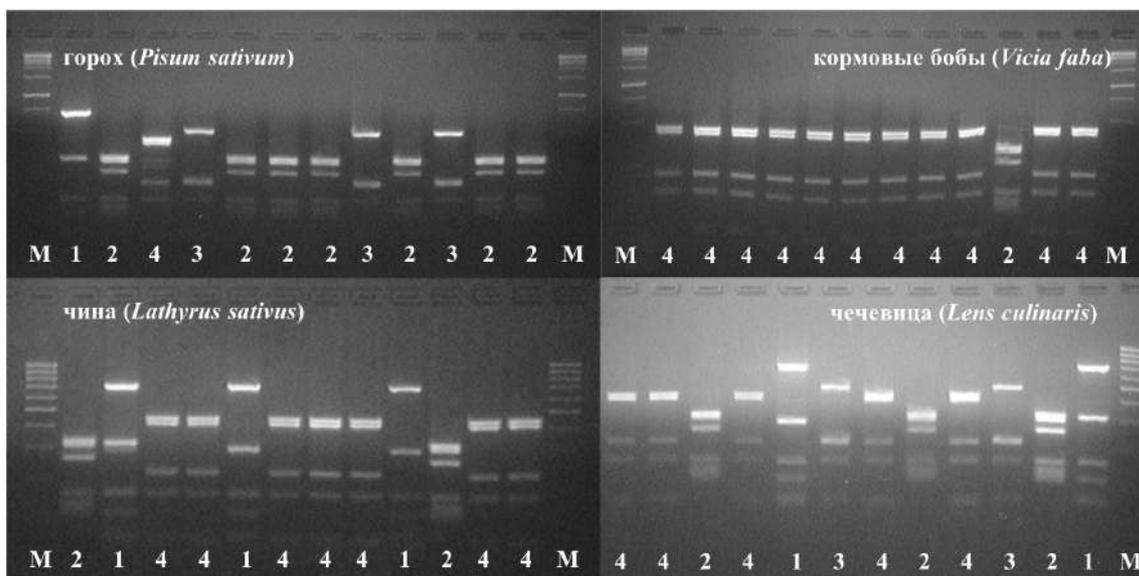


Рисунок III.28. RFLP-анализ фрагмента гена *nodD* с использованием рестриктазы *MspI*. Маркер длин ДНК 50+ bp DNA Ladder (ЗАО «Евроген»). Представлены результаты электрофоретического разделения продуктов реакции для 12 КЛОЕ каждого вида растения: чечевицы, чины, кормовых бобов и гороха. Цифрами (1 - 4) указаны соответствующие *sum*-генотипы.

В клубеньках всех опытных растений доминировал четвертый *sum*-генотип ризобий (51%), характерный для штаммов-инокулятов *Rlv* Y-2 и *Rlv* B-25. У менее четверти клубеньков был выявлен первый *sum*-генотип ризобий (13%), характерный для штаммов-инокулятов *Rlv* 65 и *Rlv* Y-7. Остальные 36% КЛОЕ были представлены вторым и третьим *sum*-генотипами аборигенных штаммов ризобий. Кроме того, выявлена явная специфичность ризобий с четвертым *sum*-генотипом – симбионтов *Vicia faba* L. (96% КЛОЕ), и ризобий со вторым *sum*-генотипом – симбионтов *Pisum sativum* L (54%). У симбионтов чины и чечевицы также преобладал четвертый *sum*-генотип (Рис. III.29).

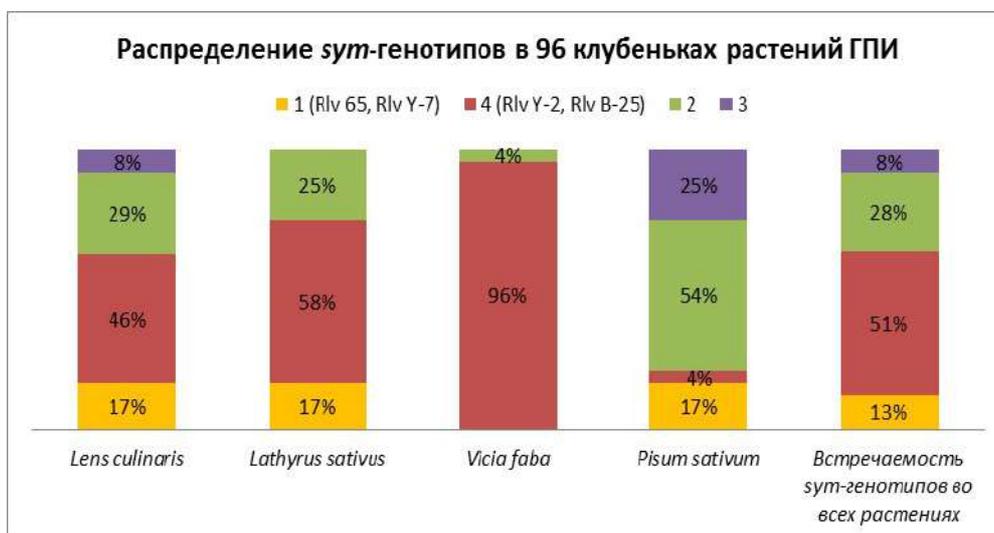


Рисунок III.29. Диаграмма распределения *sum*-генотипов КЛОЕ у растений группы перекрестной инокуляции: чечевицы, чины, бобов и гороха.

Для достоверной оценки нодуляционной конкурентоспособности производственных штаммов на фоне аборигенных клубеньковых бактерий был проведен анализ внутривидового разнообразия КлОЕ при помощи метода *hin*-регион фингерпринтинга. Ранее при работе с чистыми культурами коллекционных штаммов нами было установлено, что симбионты растений гороха и кормовых бобов относятся к двум генотипам: IA и IB, причем для изолятов ризобий бобов в подавляющем большинстве случаев характерен IB-генотип, а у изолятов гороха преобладает IA-генотип [Зотов с соавт., 2012].

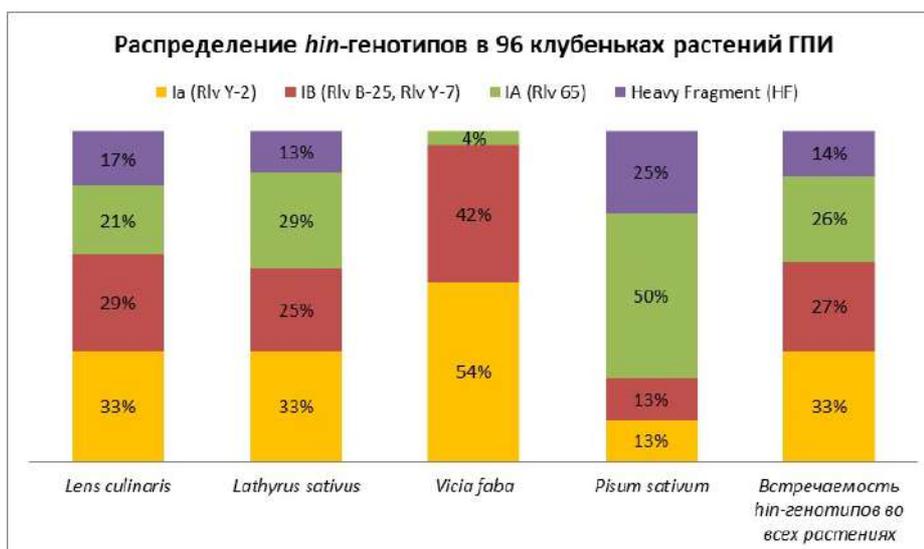


Рисунок III.30. Диаграмма распределения *hin*-генотипов КлОЕ у растений группы перекрестной инокуляции: чечевицы, чины, бобов и гороха

При проведении скрининга КлОЕ в данном исследовании было выявлено 4 генетических профиля: IA, IB, Ia и новый профиль – HF /Heavy Fragment/. Для симбионтов *V. faba* характерны Ia и IB *hin*-генотипы, для *P. sativum* - IA-генотип ризобий (Рис. III.30). Интересно, что новый генотип HF удалось обнаружить только при использовании тотальной ДНК клубеньков, в то время как при работе с генетическим материалом чистых культур ризобий он не детектировался [Martens et al., 2008; Зотов с соавт., 2013].

Ранее нами была определена структура *hin*-региона (межгенный регион, расположенный между одноименными генами тРНК-Глу) коллекционных штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* - симбионтов гороха и бобов – это генотипы IA, Ia и IB. По данным секвенирования этого межгенного региона генотип IA отличался от генотипа IB короткой вставкой (в 75 п.о.) в промоторной области второй копии гена тРНК-Глу (Рис. III.31). Генотип Ia, скорее всего, был образован путем делеции третьей копии гена тРНК-Глу в генотипе IA, либо посредством протяженной вставки между второй и третьей копиями гена тРНК. Впервые выявленный для симбионтов данных растений *hin*-генотип HF вероятно произошел от генотипа IA путем одной протяженной вставки (более 1000 п.о.) или мозаичной вставки между первой и второй

копиями гена тРНК-Глу. Поиск схожих нуклеотидных последовательностей в Генбанке в геномах ряда штаммов (*Rlv* ВИНВ 1217, CP022665.1; *Rlv* UPM791, CP025509.1) выявил вне их *hin*-регионов фрагмент данной вставки длиной 268 п.о. со сходством 87% с фаговой ДНК в непосредственной близости с генами интегразы (locus_tag="CHR56_12185"), малой субъединицы терминазы (locus_tag="CHR56_12210") и серин-рекомбиназы (locus_tag="CHR56_12220").

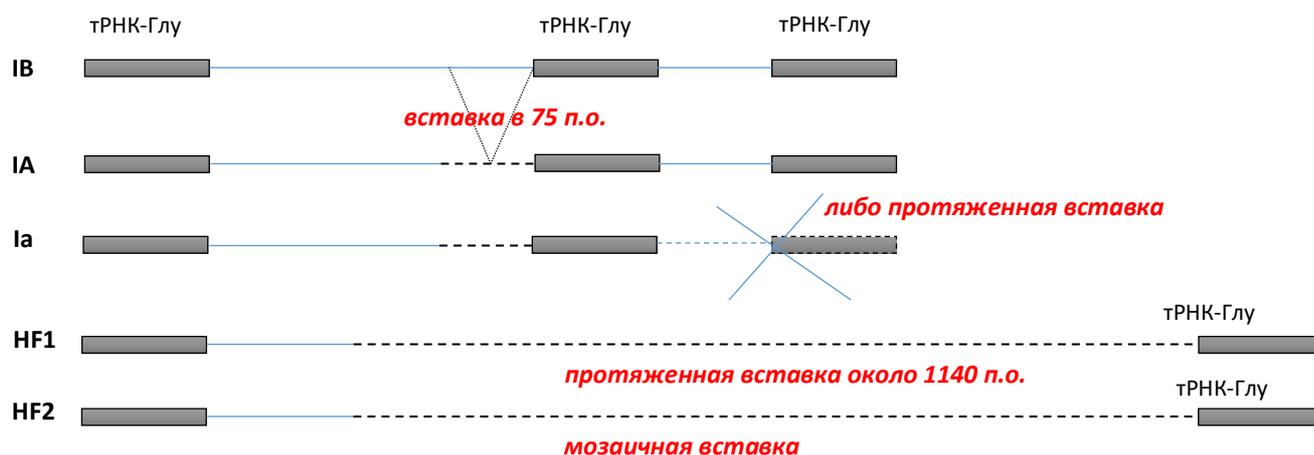


Рисунок III.31. Структура *hin*-региона *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

Сравнительный анализ данных по распределению симбиотических и хромосомных маркеров показал, что из всей выборки КлОЕ было выявлено 17 генотипов с разной комбинацией маркеров. Генотипы КлОЕ, схожие с генотипами инокулятов в клубеньках, были представлены в следующих пропорциях: *Rlv* Y-2 (32%), *Rlv* B-25 (15%), *Rlv* 65 (1%), генотип, схожий с инокулятом *Rlv* Y-7, не был обнаружен ни в одном клубеньке, несмотря на его исходную симбиотическую активность. Среди клубенек-образующих единиц гороха 50% были представлены аборигенными генотипами с комбинацией маркеров – IA / 1 (гров) / *sym*-2. Присутствие генотипов, схожих с генотипами инокулятов, в клубеньках по растениям следующее: *Pisum sativum* – 4%, *Vicia faba* – 88%, *Lens culinaris* – 42%, *Lathyrus sativus* – 54% (Табл. III.16).

Для растений *Vicia faba* L. оказалась характерной комбинация хромосомного маркера *hin*-регион Ia- и IB-генотипов с четвертым генотипом по симбиотическому маркеру - *nodD*-гену. Для растений *Pisum sativum* L. наблюдалась корреляция IA-генотипа со второй группой *sym*-генотипа. Выраженной специфичности в выборе микросимбионта у растений чины и чечевицы не выявлено. Структура *hin*-региона, а также комбинация этого маркера с *nodD*-геном, дают основание предположить, что вышеупомянутый генотип HF, возможно, возникает в случае, когда штамм, образующий клубенек у растений ГПИ, в своем составе несет «неподходящую» для данного растения (*sym*-1 и *sym*-3) плазмиду. Интересно, что второй

по представленности *sym*-генотип КлОЕ (28%) относился к местным почвенным популяциям ризобий, в то время как генотипами штаммов-инокулятов были *sym*-1 и *sym*-4.

Таблица III.16. Распределение хромосомных и симбиотических (*sym*) генотипов в клубеньках растений ГПИ.

Штамм/КлОЕ	Генотипы			Растения				Общая представленность генотипов в клубеньках
	<i>hin</i>	<i>rpoB</i>	<i>sym</i>	<i>Ps</i>	<i>Vf</i>	<i>Lc</i>	<i>Ls</i>	
<i>Rlv</i> Y-2	Ia	1	4	1	13	8	8	32%
<i>Rlv</i> 65	IA	1	1	-	-	-	1	1%
native 1	IA	1	2	12	1	5	6	25%
native 2	IB	1	1	-	-	1	-	1%
native 3	HF	1	1	-	-	-	1	1%
native 4	HF	1	2	1	-	1	-	2%
<i>Rlv</i> Y-7	IB	2	1	-	-	-	-	0%
<i>Rlv</i> B-25	IB	2	4	-	8	2	4	15%
native 5	HF	3	3	4	-	2	-	6%
native 6	IB	4	1	1	-	1	-	2%
native 7	IB	4	3	2	-	-	-	2%
native 8	IB	5	4	-	1	1	2	4%
native 9	Ia	6	1	1	-	-	-	1%
native 10	IB	7	1	-	-	1	-	1%
native 11	HF	8	1	-	-	-	1	1%
native 12	HF	9	1	1	-	-	-	1%
native 13	Ia	10	1	1	-	-	-	1%
native 14	IB	11	4	-	1	-	-	1%
native 15	IB	12	1	-	-	1	-	1%
native 16	HF	13	2	-	-	1	-	1%
native 17	HF	14	1	-	-	-	1	1%
Суммарное присутствие генотипов инокулятов в клубеньках:				1/24 (4%)	21/24 (88%)	10/24 (42%)	13/24 (54%)	

В трудах других авторов приводятся как схожие, так и отличные от полученных в настоящей работе сведения о предпочтительности и комбинации хромосомных (как правило, RFLP-16S-23S rRNA) и симбиотических маркеров во взаимодействии с растениями ГПИ в Великобритании [Mutch et al., 2004], Франции [Depret et al., 2008] и Испании [Jorin et al., 2015]. Новизна данного исследования состоит в получении доказательств в пользу того, что нодуляционная конкурентоспособность разных штаммов ризобий в образовании клубеньков у гороха и бобов (применительно к конкретному географическому положению и агроклиматическим условиям) определяется не только хромосомной частью генома (*rpoB* и *hin*-регион), но и комбинацией с *sym*-2 и *sym*-4 генотипами.

В ходе данного исследования были выявлены комбинации хромосомных и симбиотических маркеров, специфичных для конкретного растения-хозяина. В анализ генетического разнообразия клубенек-образующих единиц была добавлена оценка полиморфизма нового хромосомного маркера – *hin*-региона. По совокупности данных секвенирования тотальной ДНК каждого из клубеньков по двум маркерам (*rpoB*, *hin*-регион)

во всех 96 исследуемых образцах однозначно определялся только один генотип КлОЕ, отличных генотипов не было выявлено. Однако, это не исключало возможности наличия других штаммов бактерий в клубеньках.

Таким образом, было установлено, что только 48% клубеньков были образованы штаммами, генотипы которых схожи с таковыми у штаммов-инокулятов, главным образом *Rlv* Y-2 (Ia-генотип и *sym-4*) – 31% и *Rlv* B-25 (IB-генотип и *sym-4*) – 15%. Также было показано, что генотип активного (Nod+) штамма-инокулята *Rlv* Y-7 (IA и *sym-1*) в данном опыте клубеньков не образовал ни на одном растении ГПИ, соответственно, не может рассматриваться в качестве перспективного для них производственного инокулята.

Также при анализе тотальной ДНК клубеньков с использованием *hin*-регион ПЦР для симбионтов растений ГПИ впервые был выявлен генотип - HF (Heavy Fragment), присутствующий у аборигенных ризобий. В чистую культуру выделены два новых штамма с Ia- и HF-генотипами.

На основе результатов проведенных работ представляется возможным создание микробных биопрепаратов на основе ризобий, регулирующих рост бобовых растений (Plant growth promoting rhizobia – PGPR), с учетом выявленной растительно-микробной специфичности. Использование потенциала подобных биопрепаратов будет способствовать развитию органического земледелия, экологически безопасного растениеводства и устойчивого сельского хозяйства [Пунина с соавт., 2016; Gopalakrishnan et al., 2015].

4.2. Эффективность взаимодействия растений фасоли с ризобиями различных генотипов

На фасоли сорта Рубин в Московской области были проведены мелкоделяночные полевые испытания для оценки эффективности предпосевной моноинокуляции типовыми клубеньковыми бактериями различных генотипов в сравнении с контролем без микробной обработки. Также для выявления более конкурентоспособного генотипа по сравнению со штаммами местной популяции ризобий (*R. leguminosarum* IA-генотипа). При анализе результатов испытаний проводили оценку урожайности и содержания белка в зерне.

Предпосевная микробная инокуляция во всех вариантах приводила к увеличению всхожести растений фасоли относительно контроля без обработки. Обработка штаммами ризобий видов *E. fredii* и *R. lusitanum* приводила к значительному уменьшению как общей, так и удельной урожайности семян. В варианте со штаммом *R. leucaena* LMG 9517T достоверных отличий в урожайности данного сорта фасоли выявлено не было, в то время как обработка штаммами видов *R. etli* и *R. tropici* type B привела к существенным прибавкам урожайности –

42% и 22%, соответственно. Штамм *R. etli* DSM 11541T показал лучшие результаты и по удельной и по общей урожайности фасоли сорта Рубин.

При анализе результатов данного опыта было выявлено расщепление морфотипа семян фасоли по цвету и форме (рис. III.32). При этом степень этого расщепления в разных опытах неодинакова: от практически полного отсутствия (Контроль-, *Ensifer fredii* DSM 5851T, *R. lusitanum* LMG 22705T) до максимального проявления нехарактерного для сорта «коричневого» морфотипа по весу - 31,5% в варианте *R. etli* DSM 11541T.



Рисунок III.32. Расщепление морфотипов семян фасоли сорта «Рубин» по цвету и форме в полевом опыте при различной предпосевной обработке микробными препаратами.

Количественные изменения в урожайности обусловлены отчасти влиянием внешней среды, а отчасти генетическими различиями. В 1903 г. датский генетик Вильгельм Иоганнсен показал, что непрерывная изменчивость имеет частично средовую, частично генетическую природу (впоследствии он ввел понятия фенотипа и генотипа).

Таким образом, опираясь на ранние работы по изучению изменчивости (генетической и "средовой") количественных и качественных признаков растений, и исходя из того, что посевной материал фасоли сорта "Рубин" был генетически однородным, можно предположить, что в настоящем опыте значительное расщепление таких признаков, как цвет, форма и масса семян (также наблюдалась сцепленность этих признаков: розовые,

"плоскоовальные", большие; бурые, "прямоугольно-профильные", маленькие) были обусловлены условиями окружающей среды. Так как, за исключением вида предпосевной обработки семян, остальные факторы были одинаковыми, то можно выдвинуть гипотезу, что выявленная фенотипическая изменчивость связана с генотипами клубеньковых бактерий, вступающих с фасолью в симбиоз и/или оказывающих ассоциативный эффект на растение. Стоит отметить, что селекция сорта Рубин проводилась в почвах центральной части России на фоне доминирующего вида *R. leguminosarum* (условия варианта опыта без обработки), а все штаммы-инокуляты изначально выделены в Латинской Америке и не встречаются в опытных почвах. Вероятно, этим может объясняться эффект расщепления морфотипов фасоли, не проявлявшийся ранее в ходе селекционных работ.

Также в данном опыте наблюдалась изменчивость по интегральному показателю урожайности культуры: три вида ризобий приводили к уменьшению урожайности, несмотря на большую всхожесть семян (*Ensifer fredii*, *R. lusitanum*, *R. leucaenae*), три вида стимулировали увеличение урожайности (*R. mesoamericanum*, *R. tropici* B, *R. etli*). В итоге: штамм-инокулят вида *R. etli* оказался лидером по общей (42 %), в т.ч. удельной урожайности на 26 % относительно контроля, оказав также благотворное влияние на всхожесть.

Содержание белка было определено для каждого опыта с учетом расщепления морфопризнаков. «Коричневые» зерна содержали значительно меньше белка, чем «розовые», а максимальная прибавка относительно контроля по данному параметру выявлена в опытах с обработкой штаммами *R. lusitanum* LMG 22705T и *R. leucaenae* LMG 9517T.

Несмотря на такие разительные отличия по всем показателям в данном опыте, проведенное генотипирование КлОЕ показало, что во всех случаях клубеньки были образованы близкородственными штаммами I/A *hin*-генотипа; saAFLP (*Xma*I) профили также подтвердили единообразие местной популяции, способной к симбиозу с данными сортами фасоли, и ее более высокую конкурентоспособность по сравнению с применяемыми препаратами (рис. III.33).

Таблица III.17. Показатели урожайности в опыте на фасоли сорта «Рубин», Московская обл.

Вариант опыта	Общее кол-во растений (всхожесть, %)	Урожайность, г (розовые зерна)	Урожайность, г (коричневые зерна)	Соотношение роз/кор	Масса семян, г/раст.	Общая урожайность, г	Прибавка по общему весу, %
Контроль-	36 (72%)	930	0	-	25,8	930	-
<i>R. etli</i> DSM 11541 T	40 (80%)	1002	316	3,2:1	33,0	1318	41,7%
<i>R. tropici</i> type B DSM 11418 T	48 (96%)	1011	128	7,9:1	23,7	1139	22,5%
<i>R. mesoamericanum</i> DSM 28449 T	47 (94%)	806	194	4,2:1	21,3	1000	7,5%
<i>Ensifer fredii</i> DSM 5851 T	42 (84%)	584	47	12,4:1	17,0	631	-32,2%
<i>R. lusitanum</i> LMG 22705 T	38 (76%)	615	30	20,5:1	22,4	645	-30,6%
<i>R. leucaenae</i> LMG 9517 T	42 (84%)	828	111	7,5:1	15,0	939	1,0%
HCP ₀₅	3,24	7,00	9,40	-	2,83	2,15	-

Таблица III.18. Содержание белка в зерне фасоли сорта «Рубин», Московская обл.

Вариант опыта	Сухие вещества в зерне, %	Белок, % от СВ (розовый фенотип)	Сухие вещества в зерне, %	Белок, % от СВ (коричневый фенотип)	Общий белок с опыта, г	Прибавка по белку, %
Контроль-	90,0	25,9	-	-	216,8	-
<i>R. etli</i> DSM 11541 T	90,1	25,4	89,3	22,8	293,7	35,5
<i>R. tropici</i> type B DSM 11418 T	90,3	24,9	89,4	22,5	253,1	16,7
<i>R. mesoamericanum</i> DSM 28449 T	91	25,4	89,6	22,8	225,9	4,2
<i>Ensifer fredii</i> DSM 5851 T	89,9	24,6	88,7	22,5	138,5	-36,1
<i>R. lusitanum</i> LMG 22705 T	90,3	26,2	88,8	22	151,4	-30,2
<i>R. leucaenae</i> LMG 9517 T	90,1	26,2	89,3	24,7	219,9	1,5
HCP ₀₅	-	-	-	-	9,16	-

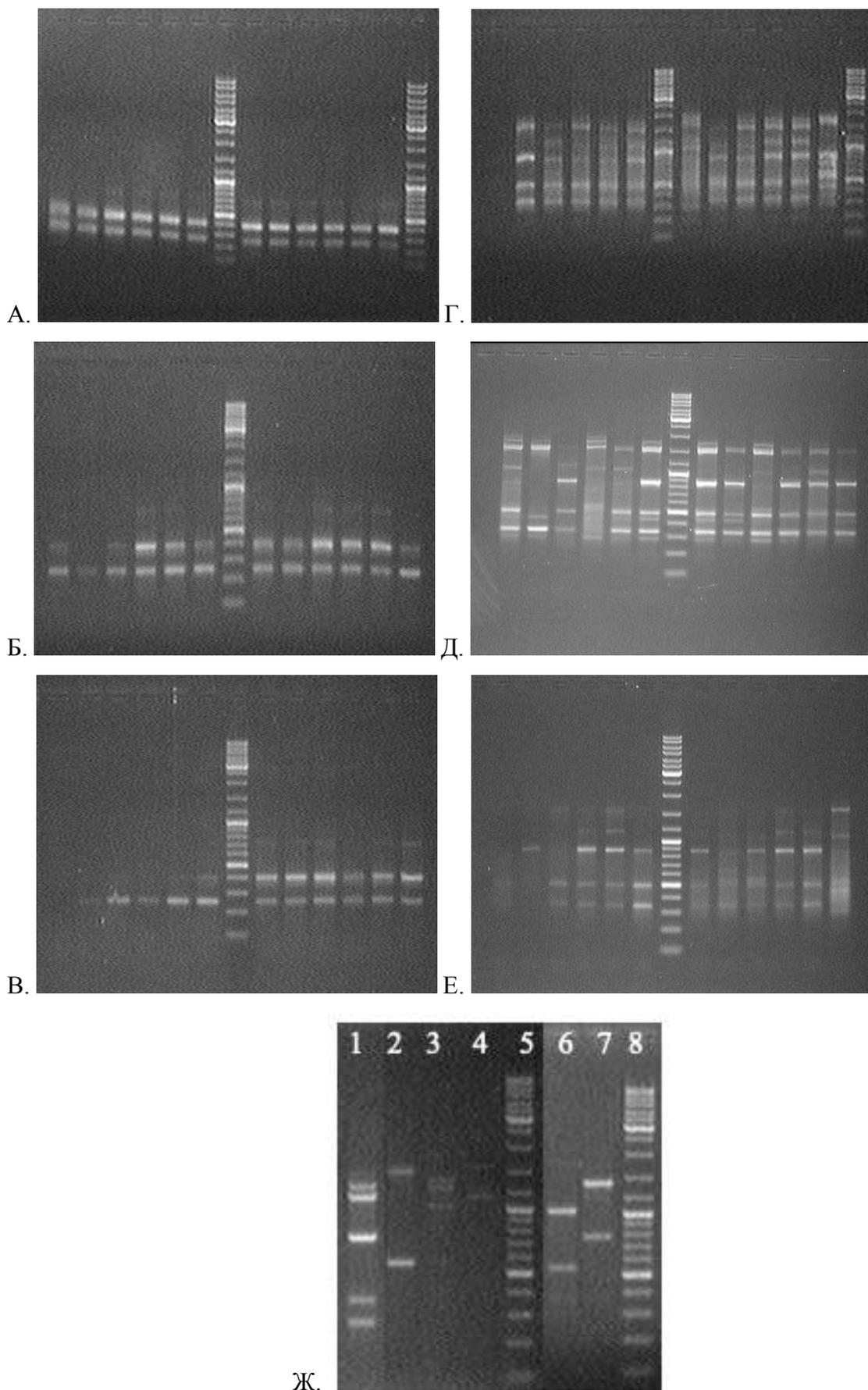


Рисунок III.33. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР КЛОЕ в опыте по моноинкуляции растений фасоли сорта «Рубин» различными штаммами ризобий.

Нin-регион ПЦР: А) *R.tropici* type B; *R. etli*, Б) *Ensifer fredii*; *R. mesoamericanum*, В) *R. leucaenae*; *R. lusitanum*.

saAFLP (XmaI): Г) *R.tropici* type B; *R. etli*, Д) *Ensifer fredii*; *R. mesoamericanum*, Е) *R. leucaenae*; *R. Lusitanum*; Ж) инокуляты: 1 - *Ensifer fredii*, 2 – *R. tropici* type B, 3 – *R. mesoamericanum*, 4 – *R. etli*, 5 – маркер ; 6 - *R. leucaenae*, 7 – *R. lusitanum*, 8 – маркер.

Результаты, полученные в рамках данного опыта, требуют более детального изучения на междисциплинарном уровне для подтверждения выявленных взаимосвязей.

4.3. Персонализированные формулы биопрепаратов на примере симбиоза с различными сортами сои

Схема проведенных полевых опытов предполагала сравнение влияния, выявленного в результате проведения лабораторных опытов, перспективного штамма *B. diazoefficiens* ССМ GS-4 с применяемыми техническими штаммами, показавшими лучшие результаты по исследуемым показателям при предыдущих селекциях на различных сортах сои. Из ранее представленных данных по результатам лабораторных испытаний видно, что предложенный штамм *B. diazoefficiens* ССМ GS-4 в вегетационных опытах на вермикулите активно образует азотфиксирующие клубеньки на корнях различных сортов сои и обеспечивает повышение эффективности бобово-ризобияльного симбиоза, что приводит к увеличению фитомассы растений.

В мелкоделяночном опыте были проведены испытания на производственных сортах российской селекции Зуша и Красивая Меча, в качестве инокулятов были использованы по 2 штамма из каждой генетически удаленной группы симбионтов сои (табл. III.19). Отрицательным контролем служил вариант опыта без микробной обработки. Как видно из таблицы, в почве отсутствовали местные популяции клубеньковых бактерий сои, поэтому полученные данные являются следствием различной эффективности бобово-ризобияльного симбиоза с интродуцированными штаммами.

Таблица III.19. Мелкоделяночный опыт по изучению эффективности штаммов клубеньковых бактерий для предпосевной обработки сои сортов Зуша и Красивая Меча.

Опыт (обработка)	Группа штаммов	Среднее число клубеньков, ед./растение		Сухая надземная масса, г/растение	
		Зуша	Красивая Меча	Зуша	Красивая Меча
Контроль- (вода)	-	0	0	6,8±0,25	6,5±0,24
<i>B. japonicum</i> X-2	USDA 123	0,2±0,13	0,5±0,19	6,7±0,30	6,6±0,15
<i>B. japonicum</i> GS-2		3,06±1,21	1,6±0,25	6,8±0,14	6,7±0,14
<i>B. japonicum</i> B-1967 T	USDA 6 T	3,25±0,50	3,7±0,25	7,0±0,37	6,9±0,15
<i>B. japonicum</i> 626a		2,2±0,25	1,3±0,19	6,9±0,12	6,7±0,14
<i>B. japonicum</i> 36	USDA 4	12,5±1,96	6±1,41	8,5±0,20	8,1±0,21

<i>B. japonicum</i> M-8		22,5±2,54	23,5±2,67	8,2±1,58	8,0±1,31
<i>B. diazoefficiens</i> 634b	USDA 110 T	39,3±1,21	20,7±0,49	8,9±0,68	8,8±0,6
<i>B. diazoefficiens</i> CCM GS-4		50±7,07	22±2,55	9,1±2,74	9,0±2,51
<i>HCP_{0,5}</i>		3,63	3,12	3,44	3,45

Для последующей стадии полевых испытаний на производственных сортах российской селекции Зуша и Красивая Меча был отобран штамм *B. diazoefficiens* CCM GS-4, образующий наибольшее количество активных (розовых) клубеньков и производственные штаммы сравнения - *B. diazoefficiens* 634b и *B. japonicum* 36. Испытания проводились в Орловской области на базе ФГБНУ «ВНИИ зернобобовых и крупяных культур» (табл. III.20 и III.21).

Таблица III.20. Полевые испытания эффективности штаммов клубеньковых бактерий для предпосевной обработки сои сорта Зуша

Опыт (обработка)	Урожайность, ц/га	Прибавка к контролю		Массовая доля белка, % на сухое вещество	Прибавка по белку к контролю, %
		ц/га	%		
Контроль- (вода)	21,2±0,2	-	-	40,9±1,00	-
<i>B. japonicum</i> 36	22,9±0,04	1,7	8,0%	41,3±0,3	0,4
<i>B. diazoefficiens</i> 634b	23,1±0,4	1,9	9,0%	41,5±1,5	0,6
<i>B. diazoefficiens</i> CCM GS-4	24,7±0,8	3,5	16,5%	42,1±2,09	1,2
<i>HCP_{0,5}</i>	0,86			2,61	

Таблица III.21. Полевые испытания эффективности штаммов клубеньковых бактерий для предпосевной обработки сои сорта Красивая Меча

Опыт (обработка)	Урожайность, ц/га	Прибавка к контролю		Массовая доля белка, % на сухое вещество	Прибавка по белку к контролю, %
		ц/га	%		
Контроль- (вода)	20,0±1,5	-	-	41,8±0,80	-
<i>B. japonicum</i> 36	21,8±0,8	1,8	8,5%	42,3±0,15	0,5
<i>B. diazoefficiens</i> 634b	22,2±0,8	2,2	10,4%	42,0±2,00	0,2
<i>B. diazoefficiens</i> CCM GS-4	23,9±0,5	3,9	18,4%	43,2±1,75	1,4
<i>HCP_{0,5}</i>	1,83			2,62	

В результате проведенных полевых испытаний было показано, что перспективный штамм *B. diazoefficiens* CCM GS-4 обеспечивает максимальную прибавку урожайности сортов Зуша и Красивая Меча – 3,5 ц/га (16,5%) и 3,9 ц/га (18,4%) в сравнении с контролем, соответственно. При этом наблюдается повышение содержания белка в семенах сои сорта Зуша - на 1,2% и сорта Красивая Меча - на 1,4%. Следовательно, при обработке семян сои современных сортов отечественной селекции эффективность биоудобрений, полученных на

основе указанного штамма *B. diaoefficiens* ССМ GS-4, превышала аналогичные показатели производственного штамма *B. japonicum* 634b на 7,5-8% по показателю урожайности семян, а по содержанию сырого протеина в семенах - на 0,6-1,2%.

Это подтверждает рабочую гипотезу о необходимости создания на основе знаний о сорт-штаммовой специфичности для конкретных производственных культур персонализированных формул биопрепаратов для достижения максимальных показателей в полевых условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования была впервые проведена сравнительная оценка структуры и полиморфизма родоспецифичного маркера *hin*-регион для всех известных на настоящее время микросимбионтов фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) и растений трибы *Viciae*. Высокий уровень полиморфизма и возможность разделять бактерии на уровне вида и группы штаммов (в совокупности с другими методиками) подтверждает перспективность использования данного маркера в бактериальной систематике и таксономии.

Были предложены экспресс методики идентификации и дифференциации ризобияльных культур, позволяющие изучать биоразнообразие микросимбионтов бобовых растений и выявлять специфичность растительно-микробных взаимодействий.

На примере растений трибы *Viciae* впервые была выявлена сцепленность хромосомного маркера *hin*-региона с плазмидным *nodD*-геном штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* в рамках исследуемой выборки. Анализ тотальной ДНК клубеньков с использованием *hin*-регион ПЦР для микросимбионтов растений *Pisum sativum* впервые был выявлен генотип - HF (Heavy Fragment), присутствующий у аборигенных ризобий, обладающих повышенной конкурентоспособностью.

В рамках полевых испытаний была показана фенотипическая изменчивость фасоли обыкновенной (расщепление морфотипа семян по цвету, форме и содержанию белка), вероятно связанная с генотипами интродуцированных штаммов клубеньковых бактерий, что в свою очередь принципиально влияет не только на количество, но и качество урожая данной культуры.

В результате проведенных работ в рамках настоящего исследования был предложен и научно обоснован способ повышения эффективности бобово-ризобияльного симбиоза посредством разработки персонализированных формул полифункциональных биопрепаратов.

ВЫВОДЫ

1. Изучено биоразнообразие микросимбионтов сельскохозяйственно-значимых бобовых культур: фасоли, растений трибы *Viciae* (горох, бобы, чечевица и чина) и сои: выявлены генетически обособленные группы штаммов и предложены маркеры для экспресс-идентификации и дифференциации симбионтов данных растений, в том числе при определении клубенек-образующих единиц (КлОЕ).
2. Определён уровень внутри- и межвидового нуклеотидного полиморфизма микросимбионтов отдельных бобовых культур по каждому из маркеров, в т.ч. существенно расширена база данных по *hin*-региону и проведена ревизия таксономического положения исследуемых штаммов рода *Rhizobium*, что подтверждает перспективность использования данного маркера в бактериальной систематике и таксономии.
3. По результатам проведенных лабораторных испытаний и определении генотипов клубенёк-образующих единиц была выявлена сорт-штаммовая специфичность бобово-ризобиального симбиоза с потенциально различной эффективностью.
4. Показано, что использование микроводорослей и цианобактерий при создании консорциумов полезных микроорганизмов приводит к стабилизации состава комплексного биопрепарата (доля всех основных выявленных таксонов колеблется между 20-30%) уже после месяца хранения, однако при этом происходит смещение конкурентоспособности штаммов ризобий, образовавших большинство клубеньков, по сравнению с положительным контролем на основе чистых культур ризобий: от генотипа эффективного штамма *R. leguminosarum* IA к генотипу неэффективного штамма *P. giardinii*.
5. В условиях полевого опыта проверена гипотеза создания персонализированных формул биопрепаратов под бобовые культуры и было показано:
 - сцепленность хромосомного маркера *hin*-региона с RFLP-профилем симбиотического *nodD*-гена конкурентоспособных штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae* - запатентован перспективный штамм для предпосевной обработки семян гороха (*R. leguminosarum* CCM 32);
 - выявлено расщепление морфотипа семян фасоли по цвету и форме, вероятно связанное с генотипами интродуцированных штаммов клубеньковых бактерий, а также показана принципиально разная эффективность бобо-ризобиального симбиоза: от уменьшения (в случае генотипов *Ensifer fredii* и *R. lusitanum* – на 30%) до увеличения урожайности на 42% (в случае генома *R. etli*) относительно контроля без обработки;
 - для сортов сои отечественной селекции Зуша и Красивая Меча была показана максимальная эффективность биоудобрений, полученных на основе штаммов генотипа USDA110 - запатентован перспективный штамм для предпосевной обработки семян сои (*B. diazoefficiens* CCM GS-4).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Предложенные в работе экспресс-методики идентификации и дифференциации штаммов клубеньковых бактерий в совокупности с вегетационными испытаниями позволят выявлять перспективные штаммы для использования в качестве основы для биопрепарата под бобовые культуры.

В результате проведенных исследований нами предложены следующие штаммы клубеньковых бактерий:

- *B. diazoefficiens* ССМ GS-4 для изготовления препаратов - удобрений для предпосевной обработки семян сои в виде концентрата бактериальной суспензии с титром не менее 10^9 КОЕ/мл (Патент № 2654580).

- *R. leguminosarum* ССМ 32 для изготовления препаратов – удобрений для предпосевной обработки семян гороха (Патент № 2654578).

В рамках лабораторного опыта было доказано влияние добавления микроводорослей или цианобактерий в биопрепарат на стабильность его действия. Предполагается перспективным применение в современном растениеводстве полифункциональных консорциумов микроорганизмов как препаратов для предпосевной обработки, так и для обработки по вегетации.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, входящих в базы Web of Science и Scopus:

10. Зотов В.С., Пунина Н.В., Хапчаева С.А., Дидович С.В., Мельничук Т.Н., Топунов А.Ф. Новый таксономический маркер клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* и его эволюция // Экологическая генетика. – СПб., 2012. – Т.10, № 2. – С.50-63. (ИФ РИНЦ 0,456, DOI: <http://dx.doi.org/10.17816/ecogen10250-63>). [Zotov V.S Punina N.V. Kharпчаeva S.A. Didovich S.V. Melnichuk T.N. Topunov A.F. A new taxonomic marker of nodule bacteria of the *Rhizobium* genus and its evolution. Russian Journal of Genetics: Applied Research. 2013; 3(2):102–113].

11. Хапчаева С.А., Дидович С.В., Топунов А.Ф., Мулюкин А.Л., Зотов В.С. Специфичность симбиотических взаимодействий бактерий рода *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* с растениями трибы Viciae // Экологическая генетика. – СПб., 2018. – Т.16, № 4. – С.51-60. (ИФ Scopus 0,117, DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen16451-60>).

Автор в следующих патентах:

3. Штамм *Rhizobium leguminosarum* ССМ 32 (ВКПМ В-12661) – ризобияльный компонент микробного биопрепарата для предпосевной обработки гороха. Дидович С.В., Зотов В.С., Хапчаева С.А., Топунов А.Ф. Заявка на патент на изобретение №2017101872. Дата приоритета – 20.01.2017г. Патент на изобретение № 2654578.

4. Штамм *Bradyrhizobium diazoefficiens* ССМ GS-4 (ВКПМ В-12660) – ризобияльный компонент микробного биопрепарата для предпосевной обработки сои. Дидович С.В., Зотов В.С., Хапчаева С.А., Топунов А.Ф. Заявка на патент на изобретение №2017101873. Дата приоритета – 20.01.2017г. Патент на изобретение № 2654580.

Публикации в изданиях, входящих в базу РИНЦ (RSCI):

5. Зотов В.С., Пунина Н.В., Хапчаева С.А., Дидович С.В., Топунов А.Ф. Использование методов saAFLP и *hin*-регион ПЦР для генотипирования штаммов ризобий — симбионтов *Phaseolus vulgaris* //Таврический вестник аграрной науки. – 2013. – Т.1. – С.15-23.

6. Пунина Н.В., Макридакис Н.М., Хапчаева С.А., Дидович С.В., Топунов А.Ф. Применение молекулярных методов при создании растительных микробных препаратов // Таврический вестник аграрной науки. – 2016. – Т.5, №1. – С.20-35. (ИФ РИНЦ 0,343).

7. Дидович С.В., Москаленко С.В., Темралеева А.Д., Хапчаева С.А. "Биотехнологический потенциал почвенных цианобактерий (обзор)" // Вопросы современной альгологии. – 2017. – Т.14, №2. (ИФ РИНЦ 0,096, URL: <http://algology.ru/1170>)

8. Пыркин В.О., Хапчаева С.А., Дидович С.В., Зотов В.С. Влияние комплексных биопрепаратов на почвенный микробиом // Таврический вестник аграрной науки. – 2018. – Т.14, №2. – С. 35-45. (ИФ РИНЦ 0,333, DOI: [10.25637/TVAN.2018.02.03](https://doi.org/10.25637/TVAN.2018.02.03).)

9. Хапчаева С.А., Зотов В.С., Дидович С.В., Топунов А.Ф. Маркирование микросимбионтов *Phaseolus vulgaris* и способы повышения эффективности бобово-ризобиального симбиоза // Таврический вестник аграрной науки. – 2018. – Т.16, №4. – С. 176-191. (ИФ РИНЦ 0,333, DOI: [10.25637/TVAN2018.04.16](https://doi.org/10.25637/TVAN2018.04.16))

Прочие публикации:

10. Пунина Н.В., Зотов В.С., Хапчаева С.А. Молекулярные методы идентификации, оценки разнообразия и контроля полезных штаммов бактерий в агроценозах нута // Глава в методических рекомендациях «Экологически безопасная технология выращивания нута». Симферополь, 2014. С.13-17.

Исследования по теме диссертационной работы поддержаны следующими Институтами развития:

1. Фондом поддержки научно-практической деятельности студентов, аспирантов и молодых ученых «Национальное интеллектуальное развитие» в рамках программы «Эврика! Концепт» (договор №016/Э/03/2016) – проект «АльгоКонсорциум»;

2. Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере:
- в рамках программы «У.М.Н.И.К.» — проект «Разработка полифункциональных биопрепаратов и создание на их основе высокопродуктивных растительно-микробных систем». Победитель осеннего финала отбора (договор №1374ГУ1/2014);

- в рамках программы «СТАРТ-1» — проект «Разработка регламента на получение биопрепаратов для растениеводства на основе микробных полифункциональных консорциумов» (договор №1308ГС1/21754 от 16.06.2016);

- в рамках программы «Развитие» — проект «Разработка опытной установки и регламента на получение полифункциональных биопрепаратов, стабилизированных фототрофными микроорганизмами, с целью экологизации современного растениеводства» (договор №289ГР/19193 от 28.12.2015).

3. Командный проект с участием Хапчаевой С.А. «Адаптивные альгобиотехнологии для производственных сортов зернобобовых культур» стал победителем в номинации №4 «Удобрения будущего» в рамках Конкурса инновационных решений «УРАЛХИМ – ЭЛЕМЕНТ РОСТА» (декабрь 2018г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волкогон В.В., Надкернична О.В. Токмакова Л.М. Экспериментальна ґрунтова мікробіологія // За ред. В.В. Волкогона. К.: Аграрна наука, 2010. С. 464.
2. Волобуева О.Г., Мирошникова М.П., Наумкина Т.С. Влияние биопрепаратов и регуляторов роста на эффективность бобово-ризобиального симбиоза фасоли // Зернобобовые и крупяные культуры. 2016. Т.3. №19. С. 56-62.
3. Дидович С.В. Аналитическое моделирование продуктивности агроценозов бобовых культур // Современные проблемы сохранения плодородия черноземов: материалы международной научно-практической конференции, посвященной 170-летию В.В. Докучаева (Россия, Воронеж, 21–22 апреля 2016 г.) – Воронеж: ФГБОУ ВО Воронежский ГАУ, 2016. С. 102–106.
4. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта // Б.А. Доспехов. М.: Агропромиздат, 1985. С.351.
5. Карасев Е.С., Чижевская Е.П., Симаров Б.В., Проворов Н.А., Андронов Е.Е. Сравнительный анализ филогений симбиотических генов клубеньковых бактерий с использованием метадеревьев // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. № 5. С. 995-1003.
6. Зотов В.С., Пунина Н.В., Хапчаева С.А., Дидович С.В., Мельничук Т.Н., Топунов А.Ф. Новый таксономический маркер клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* и его эволюция // Экологическая генетика. 2012. Т.10. № 2. С. 50-63. [Zotov V.S Punina N.V. Kharpchaeva S.A. Didovych S.V. Melnichuk T.N. Topunov A.F. A new taxonomic marker of nodule bacteria of the *Rhizobium* genus and its evolution. Russian Journal of Genetics: Applied Research. 2013;3(2):102–113].
7. Зотов В.С., Пунина Н.В., Хапчаева С.А., Дидович С.В., Топунов А.Ф. Использование методов saAFLP и *hin*-регион ПЦР для генотипирования штаммов ризобий — симбионтов *Phaseolus vulgaris* // Таврический вестник аграрной науки. 2013. № 1. С. 15–23.
8. Минчева Е.В., Перетолчина Т.Е., Ижболдина Л.А., Кравцова Л.С., Щербаков Д.Ю. Эволюционные связи эндемичной зеленой водоросли озера Байкал *Draparnaldioides simplex* с небайкальскими таксонами семейства Chaetophoraceae (Chlorophyta) // Молекулярная биология. 2013. Т.47. №1. С.181–184.
9. Онищук О.П., Воробьев Н.И., Проворов Н.А. Нодуляционная конкурентоспособность клубеньковых бактерий: генетический контроль и адаптивное значение (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. Т.53. №2. С.127–135.

10. Пунина Н.В., Макридакис Н.М., Хапчаева С.А., и др. Применение молекулярных методов при создании растительных микробных препаратов // Таврический вестник аграрной науки. 2016. Т.1. №5. С.20–34.
11. Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Роль горизонтального переноса генов в эволюции клубеньковых бактерий, направляемой растением-хозяином // Успехи современной биологии. 2010. Т.130. №4. С.336-345.
12. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего // СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2009. 210с.
13. Трефилова Л.В. Использование цианобактерий в агробиотехнологии. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Саратов, 2008.
14. Чирак Е.Л., Першина Е.В., Дольник А.С., Кутовая О.В., Василенко Е.С., Когут Б.М., Мерзлякова Я.В., Андронов Е.Е. Таксономическая структура микробных сообществ в почвах различных типов по данным высокопроизводительного секвенирования библиотек гена 16S рРНК // Сельскохозяйственная биология. 2013. №3. С.100-109.
15. Adhikari D., Itoh K., Suyama K. Genetic diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulating rhizobia in Nepal // Plant and Soil. 2013. V.368. P.341 - 353.
16. Aguilar O.M. Riva O., Peltzer E. Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports co-evolution in centers of host diversification // Proceedings of the National Academy of Science. USA. 2004. V.101. P.13548-13553.
17. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool // Journal of Molecular Biology. 1990. V.215. P.403-410.
18. Alvarez-Martinez E.R., Valverde A., Ramirez-Bahena M.H., Garcia-Fraile P., Tejedor C., Mateos P.F., Santillana N., Zúñiga D., Peix A., Velázquez E. The analysis of core and symbiotic genes of rhizobia nodulating *Vicia* from different continents reveals their common phylogenetic origin and suggests the distribution of *Rhizobium leguminosarum* strains together with *Vicia* seeds // Archives of Microbiology. 2009. №191. P.659–668.
19. Amarger N. Rhizobia in the field // Advances in Agronomy. 2001. V.73. P.109-168.
20. Amarger N., Macheret V., Laguerre G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules // International Journal of Systemic Bacteriology. 1997. V.7. P.996-1006.
21. Andrews M., De Meyer S., James E.K., Stepkowski T., Hodge S. Simon M.F., Young J.P.W. Horizontal transfer of symbiosis genes within and between rhizobial genera: occurrence and importance // Genes. 2018. V.9. P.321–345.
22. Andrews M., Andrews M. E. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses (Review) // International Journal of Molecular Sciences. 2017. V.18. №4, 705p.

23. Anyango B., Wilson K.J., Beynon J.L., Giller K.E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs // *Applied and Environmental Microbiology*. 1995. V.61. P.4016-4021.
24. Aserse A.A., Räsänen L.A., Assefa F., Hailemariam A., Lindström K. Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia // *Systematic and Applied Microbiology*. 2012. V.35. №2. P.120-131.
25. Aserse A.A., Woyke T., Kyrpides N.C., Whitman W.B., Lindström K. Draft genome sequence of type strain HBR26T and description of *Rhizobium aethiopicum* sp. nov. // *Standards in Genomic Sciences*. 2017. V.12. Article number:14.
26. Auch A.F., von Jan M., Klenk H.P., Goker M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison // *Standards in Genomic Sciences*. 2010. V.2. P.117-134.
27. Bernal G., Graham P.H. Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia // *Canadian Journal of Microbiology*. 2001. V.47. P.526-534.
28. Biate D.L., Kumar L.V., Ramadoss D., Kumari A., Naik S., Reddy K.K., Annapurna K. Genetic diversity of soybean root nodulating bacteria. In: Maheshwari, D.K. (Ed.), *Bacterial Diversity in Sustainable Agriculture* // Springer International Publishing, Heidelberg, 2014. P.131-145.
29. Bitocchi E., Rau D., Bellucci E., Rodriguez M., Murgia M. L., Gioia T., Santo D., Nanni L., Attene G., Papa R. Beans (*Phaseolus* spp.) as a Model for Understanding Crop Evolution // *Frontiers in Plant Science*. 2017. V.8. Article number:722.
30. Bosworth A.H., Williams M.K., Albrecht K.A., Kwiatkowski R., Beynon J., Hankison T.R., Ronson C.W., Wacek T.J., Triplett E.W. Alfalfa yield response to inoculant with recombinant strains of *Rhizobium meliloti* with an extra copy of *dctABD* and/or modified *nifA* expression // *Applied and Environmental Microbiology*. 1994. V.60. P.3815-3832.
31. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunencko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of highthroughput community sequencing data // *Nature Methods*. 2010. V.7. №5. P.335-336.
32. Case R.J., Boucher Y., Dahllo I., Holmstrom C., Doolittle W.F., Kjelleberg S. Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies // *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. V.73. №1. P.278–288.

33. Catroux G., Amarger N. Rhizobia as soil inoculants in agriculture. In: M. J. Day and J. C. Fry, (eds) // Environmental Release of Genetically Engineered and other Microorganisms. Cambridge: Cambridge University Press. 1992. P.1-13.
34. Chaintreuil C., Giraud E., Prin Y., Lorquin J., Ba A., Gillis M., de Lajudie P., Dreyfus B. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata* // Applied and Environmental Microbiology. 2000. V.66. P.5437–5447.
35. Chen W., Wang E., Wang S., Li Y., Chen X., Li Y. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, people's republic of China // International Journal of Systemic Bacteriology. 1995. V.45. №1. P.153-159.
36. Chen W.X., Yan G.H., Li J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. // International Journal of Systemic Bacteriology. 1988. V.38. №4. P.392-397.
37. Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D.R., da Costa M.S., Rooney A.P., Yi H., Xu X.W., De Meyer S., Trujillo M.E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2018. V.68. P.461–466.
38. Chun J., Rainey F.A. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2014. V.64. P.316–324.
39. Cordeiro A.B., Ribeiro R.A., Helene L.C.F., Hungria M. *Rhizobium esperanzae* sp. nov., a N₂-fixing root symbiont of *Phaseolus vulgaris* from Mexican soils // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2017. V.67. P.3937–3945.
40. Dall’Agnol R.F., Ribeiro R.A., Delamuta J.R., Ormeño-Orrillo E, Rogel M.A., Andrade D.S., Martínez-Romero E., Hungria M. *Rhizobium paranaense* sp. nov., an effective N₂-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2014. V.64. P.3222–3229.
41. Dall’Agnol R.F., Ribeiro R.A., Ormeño-Orrillo E., Rogel M.A., Delamuta J.R., Andrade D.S., Martínez-Romero E., Hungria M. *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2013. V.63. P.4167–4173.
42. Date R.A. Inoculated legumes in cropping systems of the tropics // Field Crops Research. 2000. V.65. P.123-136.
43. de Lajudie P.M., Young J.P.W. International Committee on Systematics of Prokaryotes, Subcommittee on the taxonomy of *Rhizobium* and *Agrobacterium*. Minutes of the meeting, Budapest,

25 August 2016 // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2017. V.67. P.2485–2494.

44. de Lajudie P.M., Young J.P.W. International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of rhizobia and agrobacteria. Minutes of the closed meeting, granada, 4 September 2017 // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2018. V.68. P.3363–3368.

45. de Lajudie P.M., Andrews M., Ardley J., Eardly B., Jumas-Bilak E., Kuzmanović N., Lassalle F., Lindström K., Mhamdi R., Martínez-Romero E., Moulin L., Mousavi S.A., Nesme X., Peix A., Puławska J., Steenkamp E., Stępkowski T., Tian C., Vinuesa P., Wei G., Willems A., Zilli J., Young P. Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2019. №69. P.1852–1863.

46. Deaker R., Roughley R. J., Kennedy I. R. Legume seed inoculation technology - a review // Soil Biology and Biochemistry. 2004. V.36. P.1275-1288.

47. Delamuta J.R., Ribeiro R.A., Ormeño-Orrillo E., Melo I.S., Martínez-Romero E., Hungria M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2013. V.63. №9. P.3342-3351.

48. Delamuta J.R., Ribeiro R.A., Ormeño-Orrillo E., Parma M.M., Melo I.S., Martínez-Romero E., Hungria M. *Bradyrhizobium tropiciagri* sp. nov. and *Bradyrhizobium embrapense* sp. nov., nitrogen-fixing symbionts of tropical forage legumes // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2015. V.65. P.4424–4433.

49. Delamuta J.R.M., Ribeiro R.A., Ormeno-Orrillo E., Melo I.S., Martínez-Romero E., Hungria M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2013. V.63. P.3342–3351.

50. Dénarié J., Debelle F., Promé J.-C. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis // Annual Review of Biochemistry. 1996. V.65. P.503-535.

51. Depret G., Laguerre G. Plant phenology and genetic variability in root and nodule development strongly influence genetic structuring of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations nodulating pea // New Phytologist. 2008. V.179. №1. P.224-235.

52. Depret G., Houot S., Allard M-R., Breuil M-C., Nouaïm R., Laguerre G. Long-term effects of crop management on *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations // FEMS Microbiology Ecology. 2004. V.51. №.1. P.87–97.

53. DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., Rojas M., Brodie E.L., Keller K., Huber T., Dalevi D., Hu P., Andersen G.L. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB // *Applied and Environmental Microbiology*. 2006. V.72. P.5069–5072.
54. Ding H., Hynes M.F. Plasmid transfer systems in the rhizobia // *Canadian Journal of Microbiology*. 2009. V.55. P.917-927.
55. Downie J.A. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots // *FEMS microbiology reviews*. 2010. V.34. P.150–170.
56. Durán D., Rey L., Mayo J., Zúñiga-Dávila D., Imperial J., Ruiz-Argüeso T., Martínez-Romero E., Ormeño-Orrillo E. *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2014. V.64. P.2072–2078.
57. Ormeño-Orrillo E., Servín-Garcidueñas L.E., Rogel M.A., Gonzalez V., Peralta H., Mora J., Martínez-Romero J., Martínez-Romero E. Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics // *Systematic and Applied Microbiology*. 2015. V.38. P.287-291.
58. Eardly BD, Nour SM, van Berkum P, Selander RK. Rhizobial 16S rRNA and *dnaK* genes: mosaicism and the uncertain phylogenetic placement of *Rhizobium galegae* // *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. V.71. P.1328–1335.
59. Gage D.J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2004. V.68. P.280-300.
60. Garrido-Sanz D., Redondo-Nieto M., Mongiardini E., Blanco-Romero E., Duran D., Quelas J. I., et al. Phylogenomic analyses of *Bradyrhizobium* reveal uneven distribution of the lateral and subpolar flagellar systems, which extends to Rhizobiales // *Microorganisms*. 2019. V.7. №2. Article number:50.
61. Gaunt M.W., Turner S.L., Rigottier-Gois L., Lloyd-Macgilp S.A., Young J.P. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001. V.51. №6. P.2037-2048.
62. Gibson J.R., Slater E., Xerry J., Tompkins D.S., Owen R.J. Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori* // *Journal of Clinical Microbiology*. 1998. V.36. №9. P.2580-2585.
63. Glaeser S.P., Kämpfer P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy (Review) // *Systematic and Applied Microbiology*. 2015. V.38. P.237–245.
64. Godoy L.P., Vasconcelos A.T.R., Chueire L.M.O., Souza R.C., Nicolás M.F., Barcellos F.G., Hungria M. Genomic panorama of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15, a commercial inoculant

strain largely established in Brazilian soils and belonging to the same serogroup as USDA 123 // *Soil Biology and Biochemistry*. 2008. V.40. №11. P.2743-2753.

65. Gomes-Barcellos F., Menna P., da Silva 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 // *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. V.73. P.2635–2643.

66. Gopalakrishnan S., Sathya A., Vijayabharathi R., Varshney R.K., Gowda C.L., Krishnamurthy L. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities // *3 Biotech*. 2015. V.5. №4. P.355-377.

67. Graham P.H., Vance C.P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs // *Field Crops Research*. 2000. V.65. P.93-106.

68. Graham P.H., Sadowsky M.J., Keyser H.H., Barnett Y.M., Bradley R.S., Cooper J.E., Deley D.J., Jarvis B.D.W., Roslycky E.B., Strijdom B.W., Young J.P.W. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-nodulating and stem-nodulating bacteria // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1991. V.41. P.582–587.

69. Grange L., Hungria M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems // *Soil Biology and Biochemistry*. 2004. V.36. №9. P.1389-1398.

70. Gubry-Rangin C., Garcia M., Béna G. Partner choice in *Medicago truncatula* -*Sinorhizobium* symbiosis // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2010. V.277. P.1947–1951.

71. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucleic acids symposium series*. 1999. V. 41. №41. P.95-98.

72. Ham G.E., Frederick L.R., Anderson I.C. Serogroups of *Rhizobium japonicum* in soybean nodules sampled in Iowa // *Agronomy Journal*. 1971. V.63. №1. P.69-72.

73. Han S.Z., Wang E.T., Chen W.X. Diverse bacteria isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* and species within the genera *Campylotropis* and *Cassia* grown in China // *Systematic and Applied Microbiology*. 2005. V.28. P.265-276.

74. Harrison P.W., Lower R.P.J., Kim N.K.D., Young J.P.W. Introducing the bacterial ‘chromid’: not a chromosome, not a plasmid // *Trends Microbiology*. 2010. V.18. P.141–148.

75. Hungria M., Campo R.J., Chueire L.M.O., Grange L., Megías M. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil // *Biology and Fertility of Soils*. 2001. V.33. P.387-394.

76. Hynes R.K., Craig K.A., Covert D., Smith R.S., Rennie R.J. Liquid rhizobial inoculants for lentil and field pea // *Journal of Production Agriculture*. 1995. V.8. P.547-552.

77. Janssen P., Coopman R., Huys G., Swings J., Bleeker M., Vos P., Zabeau M., Kersters K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy // *Microbiology*. 1996. V.142. №7. P.1881-1893.
78. Jorin B., Imperial J. Population Genomics Analysis of Legume Host Preference for Specific Rhizobial Genotypes in the *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Symbioses // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2015. V.28. №3. P.310-8.
79. Jones K.M., Kobayashi H., Davies B., Taga M.E., Walker G.C. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model // *Nature Reviews Microbiology*. 2007. V.5. P.619-633.
80. Kimura M.A. A simple method for estimating evolutionary rate at base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // *Journal of Molecular Evolution*. 1980. V.16. №2. P.111-120.
81. Konstantinidis K.T., Tiedje J.M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes // *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 2005. V.102. P.2567–2572.
82. Kouchi H., Imaizumi-Anraku H., Hayashi M., Hakoyama T., Nakagawa T., Umehara Y., Suganuma N., Kawaguchi M. How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground // *Plant and Cell Physiology*. 2010. V.51. P.1381–1397.
83. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // *Briefings in Bioinformatics*. 2004. V.5. №2. P.150-163.
84. Laguerre G., Louvrier P., Allard M.R., Amarger N. Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* for nodulation of host legumes // *Applied and Environmental Microbiology*. 2003. V.69. №4. P.2276–2283.
85. 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-RFLP analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars // *Applied and Environmental Microbiology*. 1996. V.62. №6. P.2029–2036.
86. Laguerre G., Mazurier S.I., Amarger N. Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations // *FEMS Microbiology Ecology*. 1992. V.10. №1. P.17-26.
87. Laguerre G., Nour S.M., Macheret V., Sanjuan J., Drouin P., Amarger N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts // *Microbiology*. 2001. V.147. №4. P.981-993.
88. Li Q.Q., Wang E.T., Chang Y.L., Zhang Y.Z., Zhang Y.M., Sui X.H., Chen W.F., Chen W.X. *Ensifer sojae* sp. nov., isolated from root nodules of *Glycine max* grown in saline-alkaline soils // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2011. V.61. P.1981–1988.

89. Long S.R. Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective // Plant Cell. 1996. V.8. P.1885–1898.
90. López-López A., Rogel-Hernandez M.A., Barois I., Ortiz Ceballos A.I., Martínez J., Ormeño-Orrillo E., Martínez-Romero E. *Rhizobium grahamii* sp. nov., from nodules of *Dalea leporina*, *Leucaena leucocephala* and *Clitoria ternatea*, and *Rhizobium mesoamericanum* sp. nov., from nodules of *Phaseolus vulgaris*, siratro, cowpea and *Mimosa pudica* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2012. V.62. P.2264–2271.
91. López-López A., Negrete-Yankelevich S., Rogel M. A., Ormeño-Orrillo E., Martínez J., Martínez-Romero E. Native bradyrhizobia from Los Tuxtlas in Mexico are symbionts of *Phaseolus lunatus* (Lima bean) // Systematic and Applied Microbiology. 2013. V.36. P.33–38.
92. Louvrier P., Laguerre G., Amarger N. Distribution of symbiotic genotypes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations isolated directly from soils // Applied and Environmental Microbiology. 1996. V.62. №11. P.4202-4205.
93. Madrzak C.J., Golinska B., Krolczak J., Pudelko K., Lazewska D., Lampka B., Sadowsky M.J. Diversity among Field Populations of *Bradyrhizobium japonicum* in Poland // Applied and Environmental Microbiology. 1995. V.61. №4. P.1194-1200.
94. Martens M., Dawyndt P., Coopman R., Gillis M., De Vos P., Willems A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*) // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2008. V.58. №1. P. 200-214.
95. Martínez-Hidalgo P., Hirsch A.M. The nodule microbiome: N₂ -fixing rhizobia do not live alone // Phytobiomes Journal. 2017. V.1. P.70–82.
96. Martínez-Romero E., Segovia L., Mercante F.M., Franco A.A., Graham P., Pardo M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1991. V.41. №3. P.417-426.
97. Martínez-Romero E. Diversity of *Rhizobium* – *Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives // Plant Soil 2003. V.252. P.11–23.
98. Menna P., Hungria M. Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium*: supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2011. V.61(Pt 12). P.3052–3067.
99. Mergaert P., Van Montagu M., Holsters M. Molecular mechanisms of Nod factor diversity // Molecular Microbiology. 1997. V.25. P.811-817.

100. Mnasri B., Liu T.Y., Saidi S., Chen W.F., Chen W.X., Zhang X.X., Mhamdi R. *Rhizobium azibense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from root-nodules of *Phaseolus vulgaris* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2014. V.64. P.1501– 1506.
101. Mnasri B., Saidi S., Chihaoui S.A., Mhamdi R. *Sinorhizobium americanum* symbiovar *mediterraneanse* is a predominant symbiont that nodulates and fixes nitrogen with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a Northern Tunisian field // Systematic and Applied Microbiology. 2012. V.35. P.263–269.
102. Moulin L., Bena G., Boivin-Masson C., Stepkowski T. Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2004. V.30. P.720–732.
103. Mousavi S.A., Willems A., Nesme X., de Lajudie P., Lindström K. Revised phylogeny of Rhizobiaceae: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations // Systematic and Applied Microbiology. 2015. V.38. P.84–90.
104. Mutch L.A., Young J.P. Diversity and specificity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* on wild and cultivated legumes // Molecular Ecology. 2004. V.13. №8. P.2435-2444.
105. Mutch L.A., Tamimi S. M., Young J.P.W. Genotypic characterisation of rhizobia nodulating *Vicia faba* from the soils of Jordan: A comparison with UK isolates // Soil Biology and Biochemistry. 2003. V.35. P.709-714.
106. Azani N. Babineau M., Bailey C.D., Banks H., Barbosa A.R., Pinto B.R., Boatwright J.S., Borges L.M., Brown G.K., Bruneau A., Cândido E.S., Cardoso D., Chung K.F, Clark R., de Souza Conceição A., Crisp M.D., Cubas P., Delgado-Salinas A., Dexter K.G., Doyle J.J, Duminil J., Egan A.N., de la Estrella M., Falcão M.J., Filatov D.A, Fortuna-Perez A.P., Fortunato R.H., Gagnon E., Gasson P., Rando J.G., Goulart de Azevedo Tozzi A.M., Gunn B.F., Harris D.J., Haston E., Hawkins J.A, Herendeen P.S., Hughes C.E., Vieira-Iganci J.R., Javadi F, Kanu S.A., Kazempour-Osaloo S., Kite G.C., Klitgaard B., Kochanovski F.J., Koenen E.J.M., Kovar L., Lavin M., Le Roux M.M, Lewis G.P., de Lima H.C., Lopez-Roberts M.C., Mackinder B.A., Maia V.H., Malécot V., de Freitas Mansano V., Marazzi B., Mattapha S., Miller J.T., Mitsuyuki C., de Moura T.M., Murphy D.J., Nageswara-Rao M., Nevado B., Mesquita Neves D.R., Ojeda D.I., Pennington R.T., Prado D.E., Prenner G., de Queiroz L.P., Ramos G., Ranzato Filardi F.L., Ribeiro P.G., de Lourdes Rico-Arce M., Sanderson M.J., Santos-Silva J., São-Mateus W.M.B., Silva M.S., Simon M.F, Snak C.S.C., de Souza É.R., Sprent J.I., Steele K.P., Steier J.E., Steeves R., Stirton C.H, Tagane S., Torke B.M., Toyama H., Trabuco da Cruz D., Vatanparast M., Wieringa J.J., Wink M., Wojciechowski M.F., Yahara T., Yi T., Zimmerman E. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny // The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). 2017. P. 44-77.

107. Nei M., Miller J.C. A simple method for estimating average number of nucleotidesubstitutions within and between populations from restriction data // *Genetics*. 1990. V.125. P.873–879.
108. Nei M. *Molecular evolutionary genetics* // Columbia University Press, New York. 1987. Article number: 512.
109. Nei M., Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics* // New York: Oxford University Press. 2000. P. 336.
110. Neves M.C.P., Rumjanek N.G. Diversity and adaptability of soybean and cowpea rhizobia in tropical soils // *Soil Biology and Biochemistry*. 1997. V.29. P.889-895.
111. Normand P., Cournoyer B., Simonet P., Nazaret S. Analysis of a ribosomal operon in the actinomycete *Frankia* // *Gene*. 1992. V.111. №1. P.119-124.
112. Okazaki S., Noisangiam R., Okubo T., Kaneko T., Oshima K., Hattori M., Teamtisong K., Songwattana P., Tittabutr P., Boonkerd N., Saeki K., Sato S., Uchiumi T., Minamisawa K., Teaumroong N. Genome analysis of a novel *Bradyrhizobium* sp. DOA9 carrying a symbiotic plasmid // *PLoS One*. 2015.
113. Oldroyd G.E.D., Downie J.M. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes // *Annual Review of Plant Biology*. 2008. V.59. P.519-546
114. Oldroyd G.E., Murray J.D., Poole P.S., Downie J.A. The rules of engagement in the legume–rhizobial symbiosis // *Annual Review of Genetics*. 2011. V.45. P.119– 144.
115. Ormeño-Orrillo E., Martínez-Romero E. A Genomotaxonomy View of the *Bradyrhizobium* Genus // *Frontiers in Microbiology*. 2019.
116. Ormeno-Orrillo E., Martínez-Romero E. Phenotypic tests in *Rhizobium* species description: an opinion and (a sympatric speciation) hypothesis // *Systematic and Applied Microbiology*. 2013. V.36. P.145-147.
117. Palmer K.M., Young J.P.W. Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations in arable soils than in grass soils // *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. V.66 P.2445–2450.
118. Parker C.T., Tindall B.J., Garrity G.M. International Code of Nomenclature of Prokaryotes. Prokaryotic code (2008 revision) // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019. V.69. P.S1–S111.
119. Parté A.C. LPSN–list of prokaryotic names with standing in nomenclature // *Nucleic Acids Research*. 2014. V.42. P.D613–D616.
120. Peix A., Ramirez-Bahena M.H., Velazquez E., Bedmar, E. J. Bacterial associations with legumes // *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2015. V.34. P.17–42.

121. Perret X., Staehelin C., Broughton W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000. V.64. P.180–201.
122. Piromyou P., Songwattana P., Greetatorn T., Okubo T., Kakizaki K. C., Prakamhang J., Tittabutr P., Boonkerd N., Teaumroong N., Minamisawa K. The type III secretion system (T3SS) is a determinant for rice-endophyte colonization by non-photosynthetic *Bradyrhizobium* // *Microbes and Environments*. 2015. V.30. P.291–300.
123. Provorov N.A., Andronov E.E. Evolution of root nodule bacteria: Reconstruction of the speciation processes resulting from genomic rearrangements in a symbiotic system // *Microbiology*. 2016. V.85. P.131.
124. Ramírez-Bahena M.H., García-Fraile P., Peix A., Valverde A., Rivas R., Igual J.M., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Velázquez E. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL., *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2008. V.58 (Pt 11).
125. Ramírez-Bahena, M.H., Peix, A., Rivas, R., Camacho, M., Rodríguez-Navarro, D.N., Mateos, P.F., Martínez-Molina E., Willems A., Velázquez E. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2009. V.59. P.1929–1934.
126. Rao D.L.N., Mohanty S.R., Acharya C., Atoliya N. Rhizobial taxonomy-current status (Newsletter No. 3, pp.1–4). Indo-UK Nitrogen Fixation Centre (IUNFC). 2018.
127. Rendón-Anaya M., Montero-Vargas J.M., Saburido-Álvarez S. Vlasova A., Capella-Gutierrez S., Ordaz-Ortiz J.J., Aguilar O.M., Vianello-Brondani R.P., Santalla M., Delaye L., Gabaldón T., Gepts P., Winkler R., Guigó R., Delgado-Salinas A., Herrera-Estrella A. Genomic history of the origin and domestication of common bean unveils its closest sister species // *Genome Biology*. 2017. V.18. P.60.
128. Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями. 2002. Под редакцией Тихоновича И.А., Проворова Н.А. P. 568.
129. Ribeiro R.A., Martins T.B., Ormeño-Orrillo E., Marçon Delamuta J.R., Rogel M.A., Martínez-Romero E., Hungria M. *Rhizobium ecuadorensis* sp. nov., an indigenous N₂-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2015. V.65. P.3162–3169.
130. Ribeiro R.A., Rogel M.A., López-López A., Ormeño-Orrillo E., Barcellos F.G., Martínez J, Thompson F.L., Martínez-Romero E., Hungria M. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A

strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2012. V.62. P.1179–1184.

131. Ribeiro R.A., OrmenoOrrillo E., Dall'Agnol R.F., Graham P.H., Martínez-Romero E., Hungria M. Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas // Research in Microbiology. 2013. V.164, P.740-748.

132. Richter M., Rossello-Mora R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition // Proceedings of the National Academy of Science. USA. 2009. V.106. P.19126–19131.

133. Rodríguez-Navarro D.N., Oliver I.M., Contreras M.A., Ruiz-Sainz J.E. Soybean interactions with soil microbes, agronomical and molecular aspects // Agronomy for Sustainable Development 2010. V.31. P.173-190.

134. Roman-Ponce B., Zhang J.Y., Vasquez-Murrieta S.M., Sui H.X., Chen F.W., Padilla J-C.A., Wu Guo X., Lian Gao J., Yan J., Hong Wei G., Tao Wang E. *Rhizobium acidisoli* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* in acid soils // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2016. V.66. P.398–406.

135. Sachs J.L., Russell J.E., Lii Y.E., Black K.C., Lopez G., Patil A.S. Host control over infection and proliferation of a cheater symbiont // Journal of Evolutionary Biology. 2010. V.23. P.1919–1927.

136. Saïdi S, Ramírez-Bahena MH, Santillana N, Zúñiga D, Álvarez-Martínez E, Peix A, Mhamdi R, Velázquez E. *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2014. V.64 (Pt 1). P.242-7.

137. Sanger F., Air G.M., Barrell B.G., Brown N.L., Coulson A., Fiddes C.A., Hutchison C.A., Slocombe P.M., Smith M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA // Nature. 1977. V.265. №.5596. P.687-695.

138. Sawada H., Kuykendall L.D., Young J.M. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts // The Journal of General and Applied Microbiology. 2003. V.49. №3. P.155–179.

139. Schumpp O., Deakin W.J. How inefficient rhizobia prolong their existence within nodules // Trends in Plant Science. 2010. V.15. P.189–195.

140. Seham M. H., Abd El-Rhmana A.A., Abdel-Raouf N., Ibraheem I.B.M. Role of marine macroalgae in plant protection and improvement for sustainable agriculture technology // Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. 2018. V.7. №1. P.104-110.

141. Sepúlveda E., Pérez-Mendoza D., Ramírez-Romero M.A., Soto M.J., López-Lara I.M., Geiger O., Sanjuán J., Brom S., Romero D. Transcriptional interference and repression modulate the conjugative ability of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* // Journal of Bacteriology. 2008. V.190. P.4189–4197.

142. Shamseldin A., Abdelkhalek A., Sadowsky M.J. Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review // *Symbiosis*. 2017. V.71. P.91-109.
143. Spaink H.P. The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: the ins and outs of symbiogenesis // *Annual Review of Phytopathology*. 1995. V.33 P.345–368.
144. Steenkamp E.T., Stepkowski T., Przymusiak A., Botha W.J., Law I.J. Cowpea and peanut in southern Africa are nodulated by diverse *Bradyrhizobium* strains harboring nodulation genes that belong to the large pantropical clade common in Africa // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2008. V.48. P.1131–1144.
145. Stephens J.H.G., Rask H. M. Inoculant production and formulation // *Field Crops Research*. 2000. V.65. P.249-258.
146. Stepkowski T., Hughes C.E., Law I.J., Markiewicz L., Gurda D., Chlebicka A., Moulin L. Diversification of lupine *Bradyrhizobium* strains: evidence from nodulation gene trees // *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. V.73. P.3254–3264
147. Suominen L., Roos Ch., Lortet G., Paulin L., Lindstrom K. Identification and structure of the *Rhizobium galegae* common nodulation genes: evidence for horizontal gene transfer *Molecular Biology and Evolution*. 2001. V.18. P.907–916.
148. Tamimi S.M., Young P. *Rhizobium etli* is the dominant common bean nodulating rhizobia in cultivated soils from different locations in Jordan // *Applied Soil Ecology*. 2004. V.26. №3. P.193-200
149. Tan Z., Hurek T., Vinuesa P., Muller P., Ladha J. K., Reinhold-Hurek B. Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR // *Applied and Environmental Microbiology*. 2001. V.67. P.3655–3664.
150. Thies J.E., Singleton P.W., Bohlool B.B. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes // *Applied and Environmental Microbiology*. 1991. V.57. P.19-28.
151. Tian C.F., Zhou Y.J., Zhang Y.M., Li Q.Q., Zhang Y.Z., Li D.F., Wang S., Wang J., Gilbert L.B., Li Y.R., Chen W.X. Comparative genomics of rhizobia nodulating soybean suggests extensive recruitment of lineage-specific genes in adaptations // *Proceedings of the National Academy of Science. USA*. 2012. V.109. P.8629–8634.
152. Tian C.F., Wang E.T., Wu L.J., Han T.X., Chen W.F., Gu C.T., Gu J.G., Chen W.X. *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2008. V.58. P.2871–2875.
153. Ueda T., Suga Y., Yahiro N., Matsuguchi T. Phylogeny of *Sym* plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a *nodC* segment // *Journal of Bacteriology*. 1995. V.177. №2. P.468-472.

154. Valsangiacomo C., Baggi F., Gaia V., Balmelli T., Peduzzi R., Piffaretti J.-C. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies // *Journal of Clinical Microbiology*. 1995. V.33. №7. P.1716-1719.
155. Valverde A., Igual J.M., Peix A., Cervantes E., Velázquez E. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2006. V.56. №11. P.2631-2637.
156. Vinuesa P., Leon-Barrios M., Silva C., Willems A., Jarabo-Lorenzo A., Perez-Galdona R., Werner D., Martínez-Romero E. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteeae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005. V.55. P.569–575.
157. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // *Nucleic Acids Research*. 1995. V.23. №21. P.4407-4414.
158. Wang F., Wang E.T., Wu L.J., Sui X.H., Li Y., Chen W.X. *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2011. V.61. P.2582–2588.
159. Wang J.Y., Wang R., Zhang Y.M., Liu H.C., Chen W.F., Wang E.T., Sui X.H., Chen W.X. *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013. V.63. P.616–624
160. Wang L., Cao Y., Wang E.T., Qiao Y.J., Jiao S., Liu Z.S., Zhao L., Wei G.H. Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Shaanxi Province // *Systematic and Applied Microbiology*. 2016. V.39. P.211–219.
161. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // *Journal of Bacteriology*. 1991. V.173. №2. P.697–703.
162. Willems A. The taxonomy of rhizobia: an overview // *Plant Soil*. 2006. V.287. P.3–14.
163. Willems A., Collins M.D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1993. V.43. №2. P.305-313.
164. D’Haeze W., Holsters M. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development // *Glycobiology*. 2002. V.12. №6. P.79R–105R.
165. Wu M., Scott A.J. Phylogenomic analysis of bacterial and archaeal sequences with AMPHORA2 // *Bioinformatics*. 2012. V.28. P.1033–1034.

166. Yu X., Cloutier S., Tambong J.T., Bromfield E.S.P. *Bradyrhizobium ottawaense* sp. nov., a symbiotic nitrogen fixing bacterium from root nodules of soybeans in Canada // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2014. V.64. P.3202–3207.
167. Yan H., Yan J., Sui X.H., Wang E.T., Chen W.X., Zhang X.X., Chen W.F. *Ensifer glycinis* sp. nov., a rhizobial species associated with species of the genus *Glycine* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2016 V.66. P.2910–2916.
168. Yan J., Yan H., Liu L.X., Chen W.F., Zhang X.X., Verástegui-Valdés M.M., Wang E.T., Han X.Z. *Rhizobium hidalgonense* sp. nov., a nodule endophytic bacterium of *Phaseolus vulgaris* in acid soil // Archives of Microbiology. 2017. V.199. P.97–104.
169. Young J.P., Crossman L.C., Johnston A.W., Thomson N.R., Ghazoui Z.F., Hull K.H., Wexler M., Curson A.R., Todd J.D., Poole P.S., Mauchline T.H., East A.K., Quail M.A., Churcher C., Arrowsmith C., Cherevach I., Chillingworth T., Clarke K., Cronin A., Davis P., Fraser A., Hance Z., Hauser H., Jagels K., Moule S., Mungall K., Norbertczak H., Rabinowitsch E., Sanders M., Simmonds M., Whitehead S., Parkhill J. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components // Genome Biology. 2006. V.7. №4. P.R34.
170. Young J.P.W., Johnston A.W.B. The evolution of specificity in the legume-*Rhizobium* symbiosis // Trends in Ecology and Evolution. 1989. V.4. №11. P.341–349.
171. Young J.P.W., Haukka K.E. Diversity and phylogeny of rhizobia // New Phytologist. 1996. V.133. P.87–94 .
172. Yu X., Cloutier S., Tambong J.T., Bromfield E.S. *Bradyrhizobium ottawaense* sp. nov., a symbiotic nitrogen fixing bacterium from root nodules of soybeans in Canada // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2014. V.64. P.3202–3207.
173. Zakhia F., de Lajudie P. Taxonomy of rhizobia // Agronomie. 2001. V.21. P.569–576.
174. Zhang Y.J., Zheng W.T., Everall I., Young J.P., Zhang X.X., Tian C.F., Sui X.H., Wang E.T., Chen W.X. *Rhizobium anhuiense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vicia faba* and *Pisum sativum* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2015. V.65. №9. P.2960-7.
175. Zhang Y.M., Li Y., Chen W.F., Wang E.T., Sui X.H., Li Q.Q., Zhang Y.Z., Zhou Y.G., Chen W.X. *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.) nodules // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2012. V.62. P.1951–1957.
176. Zurdo-Piñeiro J.L., García-Fraile P., Rivas R., Peix A., León-Barrios M., Willems A., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Velázquez E., van Berkum P. Rhizobia from Lanzarote, the Canary Islands, that nodulate *Phaseolus vulgaris* have characteristics in common with *Sinorhizobium meliloti* isolates from mainland Spain // Applied and Environmental Microbiology. 2009. V.75. №8. P.2354-2359.

Исследуемая выборка микросимбионтов бобовых культур

№	Штамм	Род/Вид	Растение-хозяин	Географическое происхождение	Коллекция
1	634b	<i>B. diazoefficiens</i>	Соя культурная (<i>Glycine max</i>)	Грузия	СИАМ
2	GS-4	<i>B. diazoefficiens</i>	Соя культурная (<i>Glycine max</i>)	Украина (Херсонская обл.)	ССМ
3	604k	<i>B. diazoefficiens</i>	Соя культурная (<i>Glycine max</i>)	н/д	ССМ
4	X-2	<i>B. japonicum</i>	Соя культурная (<i>Glycine max</i>)	Украина (Херсонская обл.)	ССМ
5	GS-2	<i>B. japonicum</i>	Соя культурная (<i>Glycine max</i>)	Украина (Херсонская обл.)	ССМ
6	Lj2	<i>B. japonicum</i>	Соя культурная (<i>Glycine max</i>)	Белорусь	ССМ
7	46-2	<i>B. japonicum</i>	Соя культурная (<i>Glycine max</i>)	Украина (Херсонская обл.)	ССМ
8	1D	<i>B. japonicum</i>	Соя культурная (<i>Glycine max</i>)	Украина (Винницкая обл.)	ИСХМАПП
9	626a	<i>B. japonicum</i>	Соя культурная (<i>Glycine max</i>)	Россия (Краснодарский край)	СИАМ
10	USDA 6	<i>B. japonicum</i>	Соя культурная (<i>Glycine max</i>)	США	VKM
11	8D	<i>B. japonicum</i>	Десмодиум канадский (<i>Desmodium canadense</i>)	Украина (Киевская обл.)	ИСХМАПП
12	367a	<i>B. japonicum</i>	Люпин узколистный (<i>Lupinus angustifolius</i>)	Россия (Ленинградская обл.)	СИАМ
13	6D	<i>B. ottawaense</i>	Соя культурная (<i>Glycine max</i>)	Украина (Сумская обл.)	ИСХМАПП
14	X-9	<i>B. ottawaense</i>	Соя культурная (<i>Glycine max</i>)	Украина (Херсонская обл.)	ССМ
15	AN-2	<i>B. ottawaense</i>	Соя культурная (<i>Glycine max</i>)	Украина (Кировоградская обл.)	ССМ
16	M-8	<i>B. ottawaense</i>	Соя культурная (<i>Glycine max</i>)	Россия (Амурская обл.)	ССМ
17	36	<i>B. ottawaense</i>	Соя культурная (<i>Glycine max</i>)	Украина (Херсонская обл.)	ССМ
18	Nuri 16	<i>B. ottawaense</i>	Арахис культурный (<i>Arachis hypogaea</i>)	н/д	ССМ
19	PvH3	<i>P. giardinii</i>	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Россия (КЧР)	CHWM
20	FN-8	<i>P. giardinii</i>	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
21	FS	<i>P. giardinii</i>	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
22	F-1g	<i>P. giardinii</i>	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
23	FN-4	<i>P. giardinii</i>	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
24	Pv8e	<i>P. giardinii</i>	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Россия (Москва)	CHWM
25	Pv22e	<i>P. giardinii</i>	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Россия (Москва)	CHWM
26	11541 T	<i>R. etli</i>	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Мексика, Гуанахуато	DSMZ

27	23997 T	<i>R. fabae</i>	Боб обыкновенный (<i>Vicia faba</i>)	Китай	BCCM/LMG
28	27434 T	<i>R. laguerreae</i>	Боб обыкновенный (<i>Vicia faba</i>)	Тунис	BCCM/LMG
29	682	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/A	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина	СИАМ
30	FA-4	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/A	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
31	F-1	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/A	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
32	FA-34	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/A	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
33	F-16	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/A	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
34	FA-30	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/A	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
35	FB1	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/A	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
36	FA-24	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/A	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
37	FA-23	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/A	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
38	2631	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/A	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Белоруссия (Минская обл.)	СИАМ
39	657	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/A	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	н/д	-
40	FA-2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/A	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
41	FK-0	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/b	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
42	FK-4	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/b	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
43	FK-6	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/b	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
44	FK-1	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/b	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
45	FK-3	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/b	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
46	FN-3	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/b	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
47	FA-11	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/b	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
48	FN-5	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/B	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
49	FN-12	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/B	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
50	FN-15	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> I/B	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
51	105	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> II/C	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Армения	СИАМ
52	FN	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> II/C	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
53	FA-22	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> II/C	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
54	2625	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> II/C	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Мексика	СИАМ
55	FA-20	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> II/C	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
56	FN-6	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> III	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
57	14904 T	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/A	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	н/д	BCCM/LMG
58	Y-1	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/A	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Украина (Винницкая обл.)	ССМ
59	28	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/A	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Украина (Луганская обл.)	ССМ

60	P-2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/A	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Украина (АР Крым)	ССМ
61	Ch-14	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/A	Чечевица пищевая (<i>Lens culinaris</i>)	Украина (Луганская обл.)	ССМ
62	K-29	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/A	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Украина (Луганская обл.)	ССМ
63	34	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/A	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Украина (АР Крым)	ССМ
64	65	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/A	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Украина (Одесская обл.)	ССМ
65	Y-2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/A	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Украина (Винницкая обл.)	ССМ
66	Y-4	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/A	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Украина (Винницкая обл.)	ССМ
67	Y-5	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/A	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Украина (Винницкая обл.)	ССМ
68	32	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/A	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Украина (Луганская обл.)	ССМ
69	32-2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/A	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Украина (Луганская обл.)	ССМ
70	31	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/A	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Украина (Луганская обл.)	ССМ
71	261b-st	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/A	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Украина	ССМ
72	G-8	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/A	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Украина (Харьковская обл.)	ССМ
73	24	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/A	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Украина (Луганская обл.)	ССМ
74	Y-3	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/A	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Украина (Винницкая обл.)	ССМ
75	Y-11	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/A	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Украина (Винницкая обл.)	ССМ
76	Y-12	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/A	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Украина (Винницкая обл.)	ССМ
77	96st	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/B	Боб обыкновенный (<i>Vicia faba</i>)	Литва	ВНИИСХМ
78	97st	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/B	Боб обыкновенный (<i>Vicia faba</i>)	Латвия	ВНИИСХМ
79	B-6	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/B	Боб обыкновенный (<i>Vicia faba</i>)	Украина (Винницкая обл.)	ССМ
80	B-8	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/B	Боб обыкновенный (<i>Vicia faba</i>)	Украина (Винницкая обл.)	ССМ
81	B-17	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/B	Боб обыкновенный (<i>Vicia faba</i>)	Украина (Винницкая обл.)	ССМ
82	B-18	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/B	Боб обыкновенный (<i>Vicia faba</i>)	Украина (Винницкая обл.)	ССМ
83	B-9	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/B	Боб обыкновенный (<i>Vicia faba</i>)	Украина (Винницкая обл.)	ССМ
84	B-15	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/B	Боб обыкновенный (<i>Vicia faba</i>)	Украина (Винницкая обл.)	ССМ
85	B-16	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/B	Боб обыкновенный (<i>Vicia faba</i>)	Украина (Винницкая обл.)	ССМ
86	B-25	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/B	Боб обыкновенный (<i>Vicia faba</i>)	Украина (Винницкая обл.)	ССМ
87	245a-st	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/B	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Россия (Московская обл.)	ВНИИСХМ
88	Y-7	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> I/B	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Украина (Винницкая обл.)	ССМ
89	9517 T	<i>R. leucaena</i>	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Бразилия	BCCM/LMG
90	22705 T	<i>R. lusitanum</i>	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Аркуш-ди-Валдевеш, Португалия	BCCM/LMG
91	28449 T	<i>R. mesoamericanum</i>	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Мексика, Веракруз	DSMZ

92	700-st	<i>R. phaseoli</i>	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Мексика	СИАМ
93	B-6923 T	<i>R. phaseoli</i>	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	н/д	ВКПМ
94	B-9621 T	<i>R. pisi</i>	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	н/д	ВКПМ
95	24453 T	<i>R. tibeticum</i>	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Тибет, Китай	BCCM/LMG
96	11418 T	<i>R. tropici</i> type B	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Южная Америка	DSMZ

Примечание:

BCCM/LMG (Belgian co-ordinated collections of microorganisms) – коллекция микроорганизмов Лаборатории микробиологии, Отдел биохимии и микробиологии Гентского Университета, Гент, Бельгия.

ССМ (Crimean collection of microorganisms) – авторская коллекция отдела микробиологии Института сельского хозяйства Крыма, Симферополь.

СИАМ – коллекция Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии РАСХН, Санкт-Петербург.

СНММ (Collection of Hin World Microorganisms) – авторская коллекция уникальных микроорганизмов мира лаборатории альгобиотехнологии ФИЦ Биотехнологии РАН.

DSMZ (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) – коллекция микроорганизмов и культур клеток Института Лейбница, Брауншвейг, Германия.

ВКМ - Всероссийская коллекция микроорганизмов, Пущино.

ВНИИСХМ - Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии РАСХ, Санкт-Петербург.

ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, Москва.

ИСХМАПП - авторская коллекция Института сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН.

Номера последовательностей секвенированных маркеров в базе данных GenBank NCBI

№ п/п	Штамм	Номер последовательности в базе данных GenBank NCBI, маркер
1	<i>R. phaseoli</i> штамм В-9623 Т	КC462520.1 , <i>hin</i> -регион МК633926, <i>rpoB</i>
2	<i>R. phaseoli</i> штамм CIAM 700-st	КC462518.1 , <i>hin</i> -регион КC462454.1 , 16S рРНК
3	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CIAM 682	КC462515.1 , <i>hin</i> -регион
4	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CCM F-16	МК633910, <i>rpoB</i>
5	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CCM FA-30	МК633911, <i>rpoB</i>
6	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм 657	МК633912, <i>rpoB</i>
7	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CCM FA-2	МК633913, <i>rpoB</i>
8	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CCM FK-1	МК633915, <i>rpoB</i>
9	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CCM FK-3	МК633916, <i>rpoB</i>
10	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CCM FN-12	МК633917, <i>rpoB</i>
11	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CIAM 105	МК633918, <i>rpoB</i>
12	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CCM FN	МК633919, <i>rpoB</i>
13	<i>Rhizobium</i> sp. штамм CCM FA-22	МК633920, <i>rpoB</i>
14	<i>Rhizobium</i> sp. штамм CCM FA-20	МК633922, <i>rpoB</i>
15	<i>R. phaseoli</i> штамм CIAM 2625	МК633921, <i>rpoB</i>
16	<i>R. giardinii</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм Pv8e	МК633924, <i>rpoB</i>
17	<i>R. giardinii</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм Pv22e	МК633925, <i>rpoB</i>
18	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CCM FA-11	МК633927, <i>rpoB</i>
19	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CCM FA-23	МК633928, <i>rpoB</i>
20	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CCM FN-4	МК633929, <i>rpoB</i>
21	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CIAM 2631	МК633930, <i>rpoB</i>
22	<i>R. giardinii</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм PvH3	МК633931, <i>rpoB</i>
23	<i>R. giardinii</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CCM F-1g (SVD F-1g)	КC462503.1 , <i>hin</i> -регион
24	<i>R. giardinii</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CCM FS (SVD FS)	КC462502.1 , <i>hin</i> -регион КC462439.1 , 16S рРНК
25	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> CCM FN-6 (SVD FN-6)	КC462501.1 , <i>hin</i> -регион МК633923, <i>rpoB</i>
26	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CCM FN (SVD FN)	КC462500.1 , <i>hin</i> -регион МК633919, <i>rpoB</i>
27	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CCM F-1 (SVD F-1)	КC462499.1 , <i>hin</i> -регион
28	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CCM FA-34 (SVD FA-34)	КC462498.1 , <i>hin</i> -регион
29	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CCM FA-4 (SVD FA-4)	КC462497.1 , <i>hin</i> -регион КC462447.1 , 16S рРНК МК633909, <i>rpoB</i>
30	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CCM (SVD FK-6)	КC462496.1 , <i>hin</i> -регион МК633914, <i>rpoB</i>
31	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CCM FK-4 (SVD FK-4)	КC462495.1 , <i>hin</i> -регион
32	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> штамм CCM FK-0 (SVD FK-0)	КC462494.1 , <i>hin</i> -регион КC462448.1 , 16S рРНК
33	<i>R. pisi</i> штамм В-9621 Т	МК644061, <i>rpoB</i> КC462519.1 , <i>hin</i> -регион
34	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CIAM 245a	КC462512.1 , <i>hin</i> -регион КC462452.1 , 16S рРНК

		МК644057, <i>rpoB</i>
35	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CIAM 97	КC462511.1 , <i>hin</i> -регион КC462456.1 , 16S рРНК МК644029, <i>rpoB</i>
36	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CIAM 96	КC462510.1 , <i>hin</i> -регион МК644028, <i>rpoB</i>
36	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM B-25 (SVD B-25)	КC462486.1 , <i>hin</i> -регион МК644037, <i>rpoB</i>
37	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM B-18 (SVD B-18)	КC462485.1 , <i>hin</i> -регион МК644033, <i>rpoB</i>
38	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM B-17 (SVD B-17)	КC462484.1 , <i>hin</i> -регион МК644032, <i>rpoB</i>
39	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM B-16 (SVD B-16)	КC462483.1 , <i>hin</i> -регион МК644036, <i>rpoB</i>
40	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM B-15 (SVD B-15)	КC462482.1 , <i>hin</i> -регион МК644035, <i>rpoB</i>
41	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM B-9 (SVD B-9)	КC462481.1 , <i>hin</i> -регион МК644034, <i>rpoB</i>
42	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM B-8 (SVD B-8)	КC462480.1 , <i>hin</i> -регион МК644031, <i>rpoB</i>
43	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM B-6 (SVD B-6)	КC462479.1 , <i>hin</i> -регион МК644030, <i>rpoB</i>
44	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM 261b (SVD 261b)	КC462478.1 , <i>hin</i> -регион КC462440.1 , 16S рРНК МК644051, <i>rpoB</i>
45	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM 248b (SVD 248b)	КC462477.1 , <i>hin</i> -регион КC462441.1 , 16S рРНК МК644058, <i>rpoB</i>
46	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM Y-12 (SVD Y-12)	КC462476.1 , <i>hin</i> -регион МК644056, <i>rpoB</i>
47	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM Y-11 (SVD Y-11)	КC462475.1 , <i>hin</i> -регион МК644055, <i>rpoB</i>
48	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM Y-9 (SVD Y-9)	КC462474.1 , <i>hin</i> -регион КC462443.1 , 16S рРНК МК644059, <i>rpoB</i>
49	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM Y-7 (SVD Y-7)	КC462473.1 , <i>hin</i> -регион МК644060, <i>rpoB</i>
50	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM Y-5 (SVD Y-5)	КC462472.1 , <i>hin</i> -регион МК644047, <i>rpoB</i>
51	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM Y-4 (SVD Y-4)	КC462471.1 , <i>hin</i> -регион МК644046, <i>rpoB</i>
52	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM Y-3 (SVD Y-3)	КC462470.1 , <i>hin</i> -регион МК644054, <i>rpoB</i>
53	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM Y-2 (SVD Y-2)	КC462469.1 , <i>hin</i> -регион КC462445.1 , 16S рРНК МК644045, <i>rpoB</i>
54	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM Y-1 (SVD Y-1)	КC462468.1 , <i>hin</i> -регион КC462444.1 , 16S рРНК МК644038, <i>rpoB</i>
55	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM 65 (SVD 65)	КC462467.1 , <i>hin</i> -регион КC462442.1 , 16S рРНК МК644044, <i>rpoB</i>
56	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм CCM 34 (SVD 34)	КC462466.1 , <i>hin</i> -регион

		МК644043, <i>rpoB</i>
57	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм ССМ 32-2 (SVD 32-2)	КС462465.1 , <i>hin</i> -регион МК644049, <i>rpoB</i>
58	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм ССМ 32 (SVD 32)	КС462464.1 , <i>hin</i> -регион МК644048, <i>rpoB</i>
59	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм ССМ 31 (SVD 31)	КС462463.1 , <i>hin</i> -регион КС462449.1 , 16S рРНК МК644050, <i>rpoB</i>
60	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм ССМ 28 (SVD 28)	КС462462.1 , <i>hin</i> -регион МК644039, <i>rpoB</i>
61	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм ССМ 24 (SVD 24)	КС462461.1 , <i>hin</i> -регион МК644053, <i>rpoB</i>
62	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм ССМ К-29 (SVD К-29)	КС462460.1 , <i>hin</i> -регион МК644042, <i>rpoB</i>
63	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм ССМ Р-2 (SVD Р-2)	КС462459.1 , <i>hin</i> -регион МК644040, <i>rpoB</i>
64	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм ССМ G-8 (SVD G-8)	КС462458.1 , <i>hin</i> -регион МК644052, <i>rpoB</i>
65	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> штамм ССМ Ch-14 (SVD Ch-14)	КС462457.1 , <i>hin</i> -регион МК644041, <i>rpoB</i>

Типовые штаммы различных видов *Rhizobium* sp.

№ п/п	Род/вид	Авторы	Год	Растение-хозяин	Ссылка на коллекцию	Типовой штамм*	Ссылка на статью
1	<i>Bradyrhizobium daqingense</i>	Wang J.Y.	2013	<i>Glycine max</i>	LMG 26137	<i>Bradyrhizobium daqingense</i> CGMCC 1.10947	10.1099/ijs.0.034280-0
2	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	Delamuta J.R.	2013	<i>Glycine max</i>		<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110	10.1099/ijs.0.049130-0
3	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Kuykendall et al.	1993	<i>Glycine max</i>	DSM 11554	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 76	10.1139/m92-082
4	<i>Bradyrhizobium huanghuaihaiense</i>	Zhang Y.M.	2012	<i>Glycine max</i>	LMG 26136	<i>Bradyrhizobium huanghuaihaiense</i> CGMCC 1.10948	10.1099/ijs.0.034546-0
5	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Jordan	1982	<i>Glycine max</i>	DSM 30131	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	-
6	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	Xu L.M.	1995	<i>Glycine max</i>	DSM 24092	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> USDA 3622	10.1099/00207713-45-4-706
7	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i>	Yu et al.	2014	<i>Glycine max</i>	LMG 26738	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i> OO99	10.1099/ijs.0.065540-0
8	<i>Ensifer fredii</i>	Young	2003	<i>Glycine max</i>	DSM 5851	<i>Ensifer fredii</i> USDA 205	10.1099/ijs.0.02665-0
9	<i>Pararhizobium giardinii</i>	Mousavi S.A. et al.	2015	<i>Phaseolus vulgaris</i>	LMG 29586	<i>Pararhizobium giardinii</i> H152	10.1016/j.syapm.2014.12.003
10	<i>Rhizobium acidisoli</i>	Roman-Ponce B. et al.	2016	<i>Phaseolus vulgaris</i>	LMG 28672	<i>Rhizobium acidisoli</i> FH13	10.1099/ijsem.0.000732
11	<i>Rhizobium aethiopicum</i>	Aserse A.A. et al.	2017	<i>Phaseolus vulgaris</i>	LMG 29711	<i>Rhizobium aethiopicum</i> HBR26	10.1186/s40793-017-0220-z
12	<i>Rhizobium anhuiense</i>	Zhang Yu J. et al.	2015	<i>Vicia faba</i>	LMG 27729	<i>Rhizobium anhuiense</i> LMG 27729	10.1099/ijs.0.000365
13	<i>Rhizobium azibense</i>	Mnasri B. et al.	2014	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	<i>Rhizobium azibense</i> 23C2 (из статьи)	10.1099/ijs.0.058651-0
14	<i>Rhizobium bangladeshense</i>	Rashid M.H. et al.	2015	<i>Lens culinaris</i>	LMG 28442	<i>Rhizobium bangladeshense</i> BLR175	10.1099/ijs.0.000373
15	<i>Rhizobium binae</i>	Rashid M.H. et al.	2015	<i>Lens culinaris</i>	LMG 28443	<i>Rhizobium binae</i> BLR195	10.1099/ijs.0.000373
16	<i>Rhizobium ecuadoreense</i>	Ribeiro R.A. et al.	2015	<i>Phaseolus vulgaris</i>	LMG 27578	<i>Rhizobium ecuadoreense</i> LMG 27578	10.1099/ijsem.0.000392
17	<i>Rhizobium esperanzae</i>	Cordeiro A.B.	2017	<i>Phaseolus vulgaris</i>	LMG 30030	<i>Rhizobium esperanzae</i> CNPSo 668	10.1099/ijsem.0.002225
18	<i>Rhizobium etli</i>	Segovia L. et al.	1993	<i>Phaseolus vulgaris</i>	LMG 17827	<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	10.1099/00207713-43-2-374
19	<i>Rhizobium fabae</i>	Tian Ch.Fu et al.	2009	<i>Vicia faba</i>	LMG 23997	<i>Rhizobium fabae</i> LMG 23997	10.1099/ijs.0.2008/000703-0
20	<i>Rhizobium freirei</i>	Dall'Agnol R.F. et al.	2013	<i>Phaseolus vulgaris</i>	LMG 27576	<i>Rhizobium freirei</i> LMG 27576	10.1099/ijs.0.052928-0

21	<i>Rhizobium gallicum</i>	Amarger N. et al.	1997	<i>Phaseolus vulgaris</i>	LMG 29587	<i>Rhizobium gallicum</i> R602sp	10.1099/00207713-47-4-996
22	<i>Rhizobium hidalgonense</i>	Yan J. et al.	2017	<i>Phaseolus vulgaris</i>	LMG 29288	<i>Rhizobium hidalgonense</i> FH14	10.1007/s00203-016-1281-x
23	<i>Rhizobium laguerreae</i>	Saïdi S. et al.	2014	<i>Vicia faba</i>	LMG 27434	<i>Rhizobium laguerreae</i> LMG 27434	10.1099/ijs.0.052191-0
24	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Ramírez-Bahena et al.	2008	<i>Pisum, Lathyrus, Vicia, Lens, Phaseolus, Trifolium</i>	LMG 14904	<i>Rhizobium leguminosarum</i> LMG 14904	10.1099/ijs.0.65621-0
25	<i>Rhizobium lentis</i>	Rashid M.H et al.	2015	<i>Lens culinaris</i>	LMG 28441	<i>Rhizobium lentis</i> BLR27	10.1099/ijs.0.000373
26	<i>Rhizobium leucaenae</i>	Ribeiro R.A. et al.	2011	<i>Leucaena leucocephala, Leucaena esculenta Phaseolus vulgaris и Gliricidia sepium</i>	DSM 26699	<i>Rhizobium leucaenae</i> CFN 299	10.1099/ijs.0.032912-0
27	<i>Rhizobium lusitanum</i>	Valverde A. et al.	2006	<i>Phaseolus vulgaris</i>	LMG 22705	<i>Rhizobium lusitanum</i> P1-7	10.1099/ijs.0.64402-0
28	<i>Rhizobium mesoamericanum</i>	López-López A. et al.	2011	<i>Phaseolus vulgaris, фиолетовый боб, вигна и Mimosa pudica</i>	DSM 28449	<i>Rhizobium mesoamericanum</i> CCGE 501	10.1099/ijs.0.033555-0
29	<i>Rhizobium paranaense</i>	Dall' Agnol R.F. et al.	2014	<i>Phaseolus vulgaris</i>	LMG 27577	<i>Rhizobium paranaense</i> LMG 27577	10.1099/ijs.0.064543-0
30	<i>Rhizobium phaseoli</i>	Ramirez-Bahena M.H. et al.	2008	<i>Phaseolus vulgaris</i>	LMG 8819	<i>Rhizobium phaseoli</i> ATCC 14482	10.1099/ijs.0.65621-0
31	<i>Rhizobium pisi</i>	Ramírez-Bahena M.H. et al.	2008	<i>Pisum sativum</i>	DSM-30132	<i>Rhizobium pisi</i> DSM 30132	10.1099/ijs.0.65621-0
32	<i>Rhizobium tibeticum</i>	Hou B.Ch. et al.	2009	<i>Trigonella archiducis-nicolai, Medicago lupulina, Medicago sativa, Melilotus officinalis, Phaseolus vulgaris, Trigonella foenum-graecum</i>	DSM 21102	<i>Rhizobium tibeticum</i> CCBAU 85039	10.1099/ijs.0.009647-0
33	<i>Rhizobium tropici</i> type B	Martínez-Romero et al.	1991	<i>Phaseolus vulgaris</i>	DSM 11418	<i>Rhizobium tropici</i> type B CIAT 899	10.1099/00207713-41-3-417
34	<i>Rhizobium vallis</i>	Wang F. et al.	2010	<i>Phaseolus vulgaris</i>	LMG 25295	<i>Rhizobium vallis</i> LMG 25295	10.1099/ijs.0.026484-0

Примечание: *- родовидовое название штамма, принятое в настоящий момент.