

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОСИМБИОНТОВ
БАЙКАЛЬСКИХ ВИДОВ ЧИНЫ (*Lathyrus*), ГОРОШКА (*Vicia*),
ОСТРОЛОДОЧНИКА (*Oxytropis*) И АСТРАГАЛА (*Astragalus*)*****И.Г. КУЗНЕЦОВА¹, А.Л. САЗАНОВА¹, В.И. САФРОНОВА¹, А.Г. ПИНАЕВ¹,
А.В. ВЕРХОЗИНА², Н.Ю. ТИХОМИРОВА¹, Ю.С. ОСЛЕДКИН¹, А.А. БЕЛИМОВ¹**

Клубеньковые бактерии (ризобии) — граммотрицательные почвенные микроорганизмы, вступающие во внутриклеточный симбиоз с бобовыми растениями и обеспечивающие фиксацию атмосферного азота. Для понимания эволюции специфических растительно-микробных взаимодействий особое значение имеют симбиотические системы с участием эндемичных или реликтовых видов. Цель нашей работы состояла в создании представительной коллекции штаммов-микросимбионтов эндемичных бобовых растений Байкальского региона, а также в оценке их биоразнообразия. Мы изучили таксономическое положение 69 штаммов, выделенных из корневых клубеньков чины низкой (*Lathyrus humilis*), горошка байкальского (*Vicia baicalensis*), астрагала монгольского (*Astragalus mongholicus*) и остролодочника лесного (*Oxytropis sylvatica*). Для первичной оценки внутривидового разнообразия штаммов проводили RFLP-анализ последовательности между генами 16S- и 23S-рРНК (ITS-региона). По его результатам исследуемые изоляты были разделены на 33 группы с идентичным набором фрагментов ДНК. Видовую принадлежность штаммов определяли методом секвенирования гена 16S-рРНК (*rrs*). Анализ его последовательности показал, что 23 штамма принадлежали к родам *Rhizobium* и *Mesorhizobium* и формировали 3 статистически достоверно различающихся кластера с уровнем поддержки более 95 %. Для уточнения таксономического положения клубеньковых бактерий рода *Bosea* использовали метод секвенирования более переменного ITS-региона. Филогенетический анализ показал значительное генетическое разнообразие микросимбионтов изученных растений. Ризобияльные изоляты принадлежали к 5 родам: *Rhizobium* (сем. *Rhizobiaceae*), *Mesorhizobium* и *Phyllobacterium* (сем. *Phyllobacteriaceae*), *Bosea* и *Tardiphaga* (сем. *Bradyrhizobiaceae*). Кроме этого, были получены изоляты, не относящиеся к клубеньковым бактериям и принадлежащие родам *Herbiconiux*, *Leifsonia*, *Burkholderia* и *Stenotrophomonas*. Известно, что некоторые виды этих родов могут присутствовать в клубеньках бобовых растений, а также быть обитателями ризосферы и филосферы различных представителей флоры. Присутствие нетипичных ризобияльных микросимбионтов в клубеньках изученных растений может свидетельствовать об активно происходящих процессах формирования взаимоотношений между партнерами в бобово-ризобияльных системах Байкальского региона.

Ключевые слова: бобовые растения Байкальского региона, таксономия ризобий, секвенирование генов рибосомальных РНК.

Клубеньковые бактерии (ризобии) — обширная генетически разнородная группа почвенных граммотрицательных микроорганизмов, способных вступать во внутриклеточный симбиоз с бобовыми растениями и обеспечивать фиксацию атмосферного азота. Одна из актуальных задач современной биотехнологии — изучение механизмов взаимодействия бобовых растений с ризобиями, что необходимо для проведения научно обоснованной селекции высокоэффективных растительно-микробных систем (1).

Для понимания эволюции специфических растительно-микробных взаимодействий особое значение имеют симбиотические системы с участием эндемичных или реликтовых бобовых растений, служащих промежуточным звеном между исчезнувшими и современными видами. К таким уникальным объектам относятся бобовые растения Байкальского региона: чина низкая (*Lathyrus humilis*) — позднеплейстоценовый реликт южносибирско-североуральского ареала (2); астрагал монгольский (*Astragalus mongholicus*) — редкое лекарственное растение (3, 4); эндемики Забайка-

* Секвенирование гена *rrs* микросимбионтов *Vicia baicalensis* было выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (Соглашение № 14-26-00094).

ля горошек байкальский (*Vicia baicalensis*) и остролодочник лесной (*Oxytropis sylvatica*) (5).

Немногочисленные данные по микросимбионтам рода *Astragalus* свидетельствуют о большом разнообразии этих микроорганизмов, которые принадлежат к различным родам порядка *Rhizobiales*: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* и *Mesorhizobium* (6-9). Виды чины и горошка нодулируются бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (10-12), среди микросимбионтов остролодочника описаны ризобияльные и мезоризобияльные штаммы (7, 13). Однако микросимбионты байкальских представителей этих родов растений ранее изучены не были.

Цель нашей работы состояла в создании представительной коллекции штаммов-микросимбионтов эндемичных бобовых растений Забайкалья (чины низкой, астрагала монгольского, горошка байкальского и остролодочника лесного), а также в определении их таксономического положения с помощью метода секвенирования 16S-рДНК и ITS-региона.

Методика. Объектом исследования были 69 штаммов, изолированных согласно описанию (14) из корневых клубеньков чины низкой *Lathyrus humilis* и горошка байкальского *Vicia baicalensis* (по две популяции), а также астрагала монгольского *Astragalus mongholicus* и остролодочника лесного *Oxytropis sylvatica* (по одной популяции), которые произрастали на побережье Чивыркуйского залива (Забайкалье). Штаммы выращивали на маннитно-дрожжевом агаре (YMA) при 28 °C (7).

Для первичной оценки внутривидового разнообразия штаммов был проведен RFLP-анализ последовательности между генами 16S- и 23S-рРНК (ITS-региона). Амплифицированную ДНК обрабатывали рестриктазой MspI, после чего проводили электрофорез рестрицированных ДНК-фрагментов в стандартном режиме (15). Видовую принадлежность штаммов определяли методом секвенирования гена 16S-рРНК (*rrs*). Для уточнения таксономического положения клубеньковых бактерий рода *Bosea* использовали метод секвенирования более варибельного ITS-региона.

Для амплификации 16S-рДНК (около 1500 bp) использовали праймеры fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и rD1 (5'-AAGGAGGTG-ATCCAGCC-3'), для амплификации ITS-региона (800 bp) — праймеры FGPS1490-72 (5'-TGCGGCTGGATCCCCTCCTT-3') и FGPL-132 (5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3'). Полученный ПЦР-продукт очищали посредством выделения из геля (15) для последующего секвенирования.

Поиск гомологичных последовательностей проводили с помощью базы данных GenBank (программа BLAST). Конструирование филогенетического дерева осуществляли в программе MEGA v. 4.0.2 (метод Neighbor-Joining). Для сравнения пар последовательностей использовали число различающихся нуклеотидов.

Результаты. Штаммы, которые были исследованы в работе, представлены в таблице.

По скорости роста изоляты разделились на две группы: у 9 штаммов видимые колонии образовывались на 5-6-е сут роста на среде YMA, остальные штаммы образовывали колонии на 3-и-4-е сут. По результатам RFLP-анализа ITS-региона исследуемые изоляты были разделены на 33 группы с идентичным набором фрагментов ДНК. Один представитель из каждой группы был отобран для секвенирования гена *rrs*. Анализ его последовательности показал, что 23 штамма принадлежали к родам *Rhizobium* и *Mesorhizobium* и формировали 3 статистически достоверно различающихся кластера с уровнем поддержки более 95 % (рис. 1).

Таксономическая структура штаммов-микросимбионтов, выделенных из корневых клубеньков у эндемичных бобовых растений Байкальского региона (по результатам секвенирования *rrs* гена и ITS-региона)

Вид микросимбионта	Номер штамма-микросимбионта бобовых растений			
	чины низкой <i>Lathyrus humilis</i>	астрагала монгольского <i>Astragalus mongholicus</i>	горошка байкальского <i>Vicia baicalensis</i>	остролодочника лесного <i>Oxytropis sylvatica</i>
<i>Rhizobium</i> sp.	2/5(1), 2/12M	—	—	—
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	1/10K, 2/10K	—	11/2, 11/3K, 11/4M, 11/7K, 11/12M, 11/19, 11/20, 11/21, 11/22, 11/23, 11/24K, 11/24M, 11/25, 11/33, 11/34K, 11/34M, 11/35, 11/36, 11/37K, 11/37M, 11/38, 11/39, 11/42K, 11/42M, 11/43K, 11/44K, 11/44M, 11/45K, 11/46, 11/47K, 11/47M, 11/48K, 11/48M, 13/3, 13/4, 13/6M, 13/7, 13/8K, 13/9M, 13/11	12/13M, 12/16K
<i>Mesorhizobium metallidurans</i>	—	3/14C1, 3/14C2	—	—
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	2/13K	—	—	—
<i>Tardiphaga robiniae</i>	1/11M	3/6M, 3/11C, 3/21(2)	—	12/11(1)
<i>Bosea</i> sp.	—	3/5M, 3/31K	—	12/22M
<i>Bosea vaviloviae</i>	—	3/25	—	—
<i>Herbiconiux</i> sp.	1/3M, 1/5M, 1/14M, 1/15M	—	—	—
<i>Burkholderia</i> sp.	—	3/8K	13/5	—
<i>Leifsonia</i> sp.	—	3/23M, 3/27K	—	—
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	—	3/17	11/7M	—
<i>Phyllobacterium</i> sp.	—	—	13/12M	—

Примечание. Прочерки означают отсутствие изолятов.

Кластер I включал 19 штаммов, изолированных из чины низкой, горошка байкальского и остролодочника лесного (соответственно 3, 14 и 2 штамма), а также два типовых штамма *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ATCC14480T и *R. leguminosarum* bv. *viciae* ATCC10004T. На основании результатов секвенирования гена *rrs* (см. табл.) изоляты 1/10K, 2/10K, 11/3K, 11/4M, 11/7K, 11/12M, 11/21, 11/23, 11/24K, 11/34M, 11/37M, 12/13M, 12/16K, 13/3, 13/4, 13/6M, 13/7M, 13/8K были идентифицированы как *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (степень сходства с типовым штаммом ATCC14480T составляла 99,7-99,9 %).

Кластер II сформировали штамм 2/5(1), изолированный из чины низкой, и типовой штамм H152T вида *Rhizobium giardinii*, который был описан для штаммов-микросимбионтов фасоли обыкновенной (16). Однако, поскольку сходство между этими штаммами по гену *rrs* составляло всего 99,0 %, штамм 2/5(1) был идентифицирован как *Rhizobium* sp. (см. табл.).

Три изолята были отнесены к роду *Mesorhizobium* (см. рис. 1, табл.). Штаммы 3/14C1 и 3/14C2 (кластер III), выделенные из астрагала монгольского, были идентифицированы как *Mesorhizobium metallidurans* и *M. ciceri* (гомология с типовыми штаммами STM2683T и NBRC100389T по гену *rrs* составила соответственно 100 и 99,6 %).

На рисунке 2 представлена *rrs*-филограмма, отражающая таксономическое положение 9 медленно растущих ризобиальных изолятов в пределах семейства *Bradyrhizobiaceae*. Штаммы 1/11M, 3/6M, 3/11C, 3/21(2), 12/11(1), выделенные из разных растений, сформировали кластер IV с ти-

повым штаммом *Tardiphaga robiniae* LMG26467T и были отнесены к этому

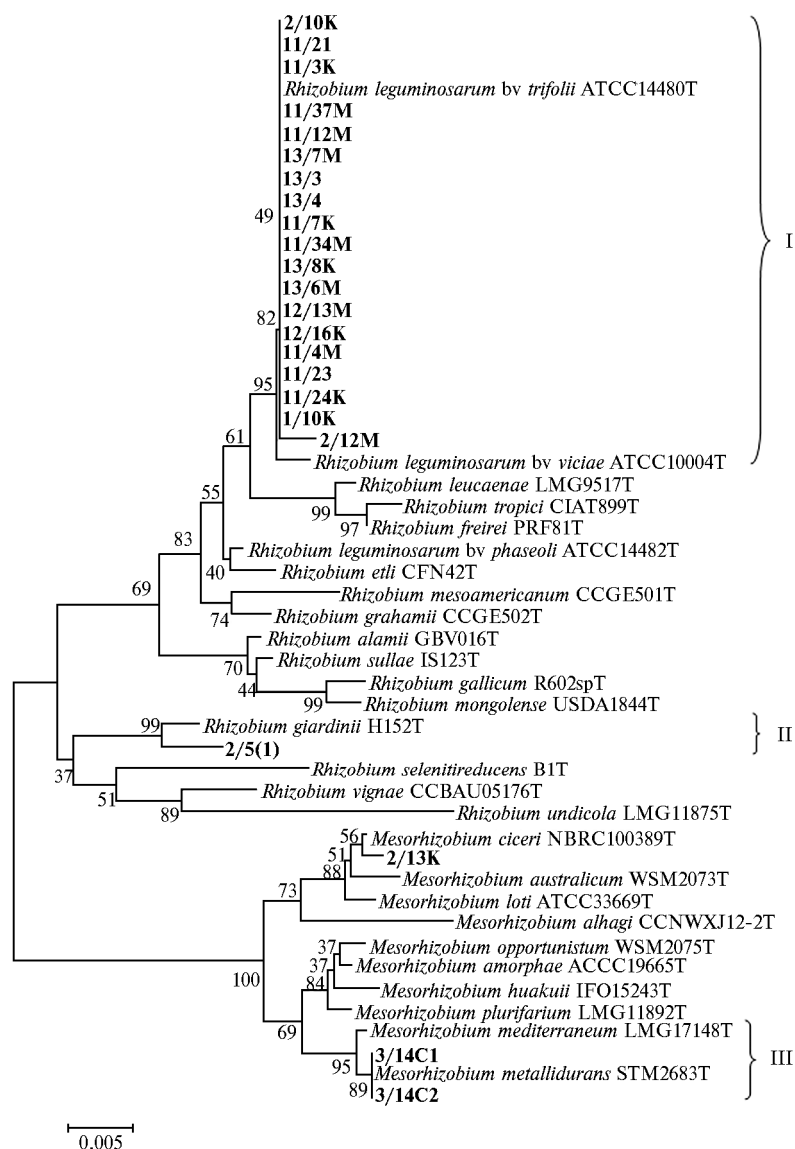


Рис. 1. *Rrs*-филограмма, отражающая таксономическое положение изолятов родов *Rhizobium* и *Mesorhizobium*. Исследуемые штаммы обозначены жирным шрифтом. Литерой «Т» отмечены типовые штаммы; I-III — статистически достоверно различающиеся кластеры.

виду (уровень сходства по гену *rrs* 99,8-99,9 %). Кластер V с уровнем статистической поддержки 99,0 % был образован четырьмя штаммами 3/5M, 3/31K, 12/22M, 3/25 и двумя типовыми штаммами рода *Bosea* (*B. lathyri* и *B. vaviloviae*). Сходство изолятов с типовыми штаммами *B. lathyri* LMG26379T и *B. vaviloviae* Vaf-18T по гену *rrs* составило соответственно 98,4-99,4 и 99,4-100 %. Следует отметить, что вид *B. vaviloviae* был описан совсем недавно, в 2015 году, для трех штаммов-микросимбионтов реликтового бобового растения *Vavilovia formosa*, произрастающего в Северной Осетии (17). Поэтому байкальские изоляты, принадлежащие к роду *Bosea* и имеющие высокую степень сходства с видом *B. vaviloviae*, представляют большой интерес для дальнейшего изучения.

У штаммов 3/5M, 3/31K, 12/22M и 3/25 был проведен анализ по-

следовательностей ITS-региона, поскольку этот метод обладает большей разрешающей способностью при идентификации близкородственных штаммов,

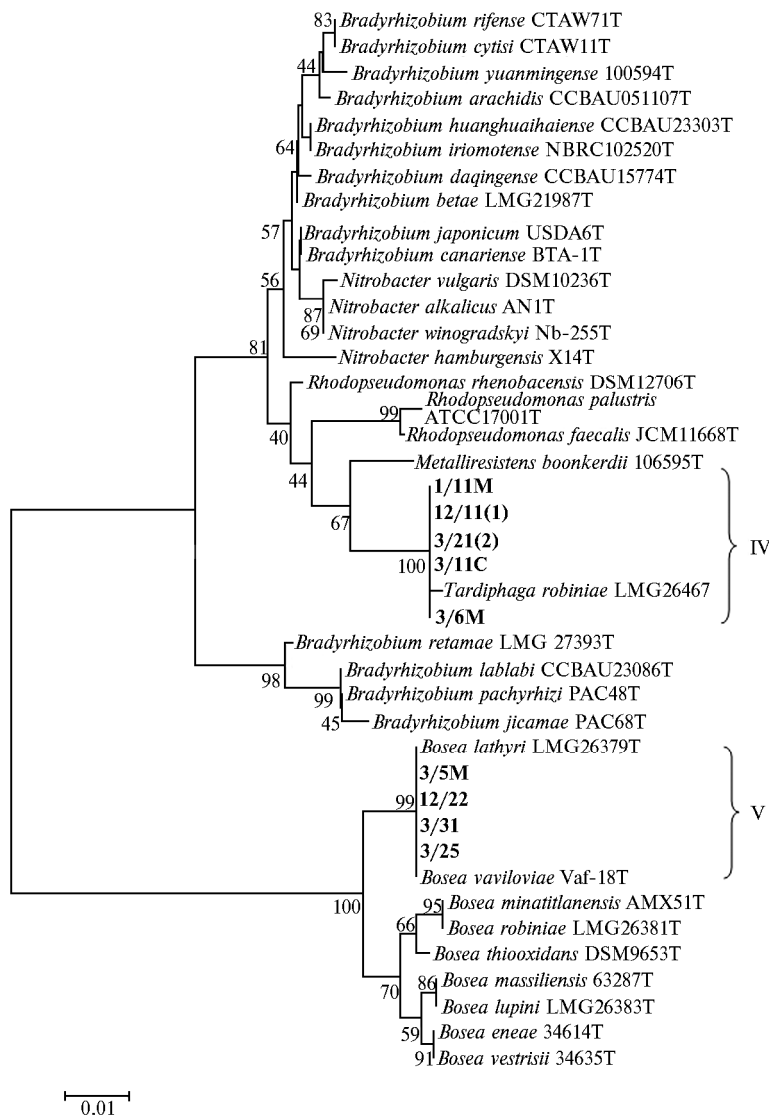


Рис. 2. *Rrs*-филограмма, отражающая таксономическое положение изолятов в пределах семейства *Bradyrhizobiaceae*. Исследуемые штаммы обозначены жирным шрифтом. Литерой «Т» отмечены типовые штаммы; IV, V — статистически достоверно различающиеся кластеры.

чем секвенирование *rrs* гена (9). Дендрограмма, представленная на рисунке 3, демонстрирует корреляцию между результатами секвенирования гена *rrs* и ITS-региона. Все изоляты кластеризовались вместе с типовыми штаммами *B. lathyri* LMG26379T и *B. vaviloviae* Vaf-18T при уровне статистической поддержки 99,0 %. Однако максимальные уровни гомологии по ITS-региону между этими изолятами и типовым штаммам *B. lathyri* и *B. vaviloviae* были низкими — соответственно 84,9 и 89,4 %. Исключением стал изолят 3/25, сходство ITS-региона которого с типовым штаммом *B. vaviloviae* Vaf-18T составило 97,8 %. На основании секвенирования гена *rrs* и последовательности ITS-региона он был отнесен к виду *B. vaviloviae*. Таксономическое положение остальных изолятов рода *Bosea* остается неясным, поскольку считается, что штаммы клубеньковых бактерий одного

вида не могут иметь меньше 95 % гомологии по ITS-региону (9). Анализ последовательностей гена *rrs* у других байкальских изолятов показал их принадлежность к родам *Herbiconiux* (4 штамма), *Leifsonia* (2 штамма), *Burkholderia* (2 штамма), *Stenotrophomonas* (2 штамма) и *Phyllobacterium* (1 штамм). По данным литературы, представители этих родов могут присутствовать в клубеньках бобовых растений (18, 19), а также быть обитателями ризосферы и филосферы различных растений (20, 21).

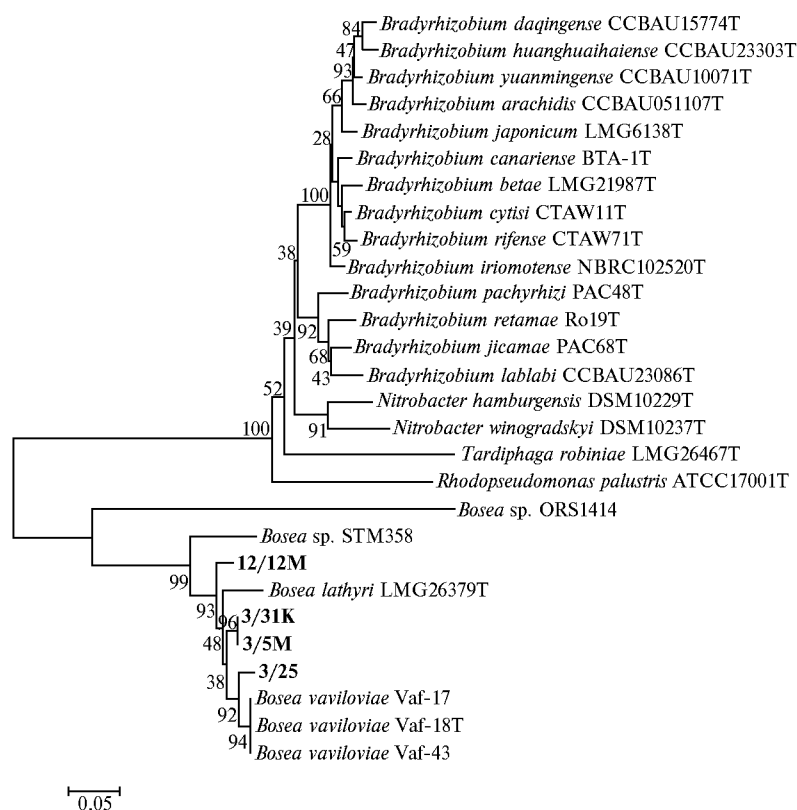


Рис. 3. ITS-филогенетическая диаграмма, отражающая таксономическое положение изолятов рода *Bosea*, выделенных из клубеньков астрагала монгольского (*Astragalus mongholicus*) и остролодочника лесного (*Oxytropis sylvatica*). Исследуемые штаммы обозначены жирным шрифтом. Литерой «Т» отмечены типовые штаммы.

Таким образом, среди микросимбионтов чины низкой встречаются ризобийные штаммы видов *Rhizobium* spp., *Mesorhizobium ciceri*, *Tardiphaga robiniae*, а также представители рода *Herbiconiux* (сем. *Microbacteriaceae*). В числе симбионтов астрагала монгольского обнаружены представители родов *Mesorhizobium*, *Bosea*, *Tardiphaga*, *Leifsonia*, *Burkholderia* и *Stenotrophomonas*. Из клубеньков остролодочника лесного были получены изоляты, относящиеся к видам *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *T. robiniae* и *Bosea* sp. Из клубеньков горошка байкальского выделены 40 штаммов, принадлежащих к виду *R. leguminosarum* bv. *trifolii* и по одному представителю родов *Phyllobacterium* и *Burkholderia*. Следует отметить, что присутствие нетипичных ризобийных микросимбионтов в клубеньках бобовых растений (*M. ciceri* и *T. robiniae* у чины; *Bosea* spp. и *T. robiniae* у астрагала и остролодочника; *Phyllobacterium* sp. у горошка) может свидетельствовать об активных процессах формирования взаимоотношений между партнерами в бобово-ризобийных системах Байкальского региона.

Авторы благодарят сотрудников СИФИБР СО РАН Л.Е. Макарову за помощь в организации экспедиции на побережье Чивыркуйского залива и А.А. Киселеву за проведение идентификации растений.

¹ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: v.safronova@rambler.ru;

²ФГБНУ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
664033 Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132

Поступила в редакцию
30 марта 2015 года

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2015, V. 50, № 3, pp. 345-352

GENETIC DIVERSITY AMONG MICROSymbionTS OF *Lathyrus*, *Vicia*, *Oxytropis* AND *Astragalus* LEGUME SPECIES FROM BAIKAL REGION

I.G. Kuznetsova¹, A.L. Sazanova¹, V.I. Safronova¹, A.G. Pinaev¹, A.V. Verkhovina²,
N.Yu. Tikhomirova¹, Yu.S. Osledkin¹, A.A. Belimov¹

¹All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Federal Agency of Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail v.safronova@rambler.ru;

²Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Federal Agency of Scientific Organizations, 132, ul. Lermontova, Irkutsk, 664033 Russia

Supported in part by Russian Science Foundation (Agreement number 14-26-00094) (sequencing of the isolates from *Vicia baicalensis*)

Received March 30, 2015

doi: 10.15389/agrobiol.2015.3.345eng

Abstract

Rhizobia are Gram-negative soil microorganisms that form intracellular nitrogen-fixing symbiosis with leguminous plants. Investigations of symbiotic systems with the participation of endemic or relict species have a particular importance for understanding of the evolution of plant-microbe interactions. The purpose of our work was to create a representative collection of microsymbionts of endemic Baikal legumes, as well as to estimate their biodiversity. The study of taxonomic positions of 69 isolates from root nodules *Lathyrus humilis*, *Vicia baicalensis*, *Astragalus mongholicus* and *Oxytropis sylvatica* was conducted. For primary identification of these isolates the methods of ITS-RFLP analysis was used that divided strains into 33 groups with identical DNA-profile. Then the taxonomy positions of isolates were determined by the 16S rRNA gene (*rrs*) and ITS region sequencing. Phylogenetic analysis revealed the considerable genetic diversity among microsymbionts of plants studied. Rhizobial isolates belonged to 5 genera: *Rhizobium* (family *Rhizobiaceae*), *Mesorhizobium* and *Phyllobacterium* (family *Phyllobacteriaceae*), *Bosea* and *Tardiphaga* (family *Bradyrhizobiaceae*). In addition, non-rhizobial isolates belonging to the genera *Herbiconiux*, *Leifsonia*, *Burkholderia* and *Stenotrophomonas* were obtained. It is known that some species of these genera may be present in the nodules of legumes, but also be inhabitants of rhizosphere or phyllosphere of different plants. The presence of atypical rhizobial microsymbionts in the studied plants was noted, which may indicate the active formation of relationships between partners in the legume-rhizobial systems of Baikal region.

Keywords: legumes of Baikal region, taxonomy of rhizobia, ribosomal genes sequencing.

REFERENCES

1. Tikhonovich I.A., Borisov A.Yu., Tsyganov V.E. *Uspekhi sovremennoi biologii*, 2005, 125(3): 227-238.
2. *Krasnaya kniga KhMAO — Yugry. Vstrechi s zhivotnymi i rasteniyami*, 2015 [The Red Book of Khanty-Mansiysk — Yugra. Meeting with animals and plants] (<http://animals.ecougra.ru>).
3. Choi I.-S., Choi B.-H. Isolation and characterization of ten microsatellite loci from Korean *Astragalus mongholicus* (*Fabaceae*). *J. Genet.*, 2013, 92: 73-76 (<http://www.ias.ac.in/jgenet/OnlineResources/92/e73.pdf>).
4. Kuz'mina E.A. *Klonal'noe mikrorazmnozhenie astragala mongol'skogo (Astragalus mongholicus Bge.)* [Clonal micropropagation of *Astragalus mongholicus* Bge.]. Moscow, 2012 (http://www.rusnauka.com/29_NIOXXI_2012/Biologiya/11_117925.doc.htm).
5. Polozhii V.A., Vydrina S.N., Kurbatskii V.I., Nikiforova O.D. *Flora Sibiri. Tom 9 Fabaceae (Leguminosae)* [Flora of Siberia. V. 9. *Fabaceae (Leguminosae)*]. Novosibirsk, 1994.

6. Gao J., Terefework Z., Chen W., Lindstrom K. Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* growing in different geographical regions of China. *J. Biotechnol.*, 2001, 91: 155-168 (doi: 10.1016/S0168-1656(01)00337-6).
7. Laguerre G., van Berkum P., Amarger N., Prevost D. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63(12): 4748-4758.
8. Wdowiak S., Malek W. Numerical analysis of *Astragalus cicer* microsymbionts. *Curr. Microbiol.*, 2000, 41: 142-148 (doi: 10.1007/s002840010108).
9. Safronova V.I., Chizhevskaya E.P., Belimov A.A., Pavlova E.A. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2011, 3: 61-64 (<http://www.agrobiology.ru/3-2011pavlova.html>).
10. Drouin R., Prevost D., Antoun H. Physiological adaptation to low temperatures of strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* associated with *Lathyrus* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2000, 32: 111-120 (doi: 10.1111/j.1574-6941.2000.tb00705.x).
11. Drouin R., Prevost D., Antoun H. Classification of bacteria nodulating *Lathyrus japonicus* and *Lathyrus pratensis* in Northern Quebec as strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1996, 46(4): 1016-1024 (doi: 10.1099/00207713-46-4-1016).
12. Van Cauwenberghe J., Verstraete B., Lemaire B., Lievens B., Michiels J., Honnay O. Population structure of root nodulating *Rhizobium leguminosarum* in *Vicia cracca* populations at local to regional geographic scales. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2014, 37(8): 613-621 (doi: 10.1016/j.syapm.2014.08.002).
13. Zhang R.J., Hou B.C., Wang E.T., Li Y. Jr., Zhang X.X., Chen W.X. *Rhizobium tubonense* sp. nov., isolated from root nodules of *Oxytropis glabra*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2011, 61(3): 512-517 (doi: 10.1099/ijs.0.020156-0).
14. Novikova N., Safronova V. Transconjugants of *Agrobacterium radiobacter* harbouring *sym* genes of *Rhizobium galegae* can form an effective symbiosis with *Medicago sativa*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1992, 93: 261-268 (doi: 10.1016/0378-1097(92)90472-Z).
15. Rumyantseva M.L., Simarov B.V., Onishchuk O.P., Andronov E.E., Chizhevskaya E.P., Belova V.S., Kurchak O.N., Muntyan A.N., Rumyantseva T.B., Zatoevskaya T.V. *Biologicheskoe raznoobrazie kluben'kovykh bakterii v ekosistemakh i agrotsenozakh. Teoreticheskie osnovy i metody [Nodule bacteria biodiversity in ecosystems and agrocenoses. Theretical basis and methods]*. St. Petersburg, 2011.
16. Amarger N., Macheret V., Laguerre G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, 47(4): 996-1006 (doi: 10.1099/00207713-47-4-996).
17. Safronova V.I., Kuznetsova I.G., Sazanova A.L., Kimeklis A.K., Belimov A.A., Andronov E.E., Pinaev A.G., Chizhevskaya E.P., Pukhaev A.R., Popov K.P., Willems A., Tikhonovich I.A. *Bosea vaviloviae* sp. nov. a new species of slow-growing rhizobia isolated from nodules of the relict species *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2015, 107: 911-920 (doi: 10.1007/s10482-015-0383-9).
18. Sardoso J.D., Hungria M., Andrade D.S. Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 93: 2035-2049 (doi: 10.1007/s00253-011-3708-2).
19. Lei X., Wang E.T., Chen W.F., Sui X.H., Chen W.X. Diverse bacteria isolated from root nodules of wild *Vicia* species grown in temperate region of China. *Microbiology*, 2008, 190(6): 657-671 (doi: 10.1007/s00203-008-0418-y).
20. Qiu F., Huang Y., Sun L., Zhang X., Liu Z., Song W. *Leifsonia ginsengi* sp. nov., isolated from ginseng root. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2007, 57(2): 405-408 (doi: 10.1099/ijs.0.64487-0).
21. Behrendt U., Schumann P., Hamada M., Suzuki K., Spröer C., Ulrich A. Reclassification of *Leifsonia ginsengi* (Qiu et al. 2007) as *Herbiconiux ginsengi* gen. nov., comb. nov. and description of *Herbiconiux solani* sp. nov., an actinobacterium associated with the phyllosphere of *Solanum tuberosum* L. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2011, 61(5): 1039-1047 (doi: 10.1099/ijs.0.021352-0).