

Агросистемы будущего — от эксперимента к практике**Микробиопрепараты**

УДК 579.841.3:579.64:579.262:582.736

doi: 10.15389/agrobiology.2023.3.403rus

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И СИМБИОТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ МИКРОСИМБИОНТОВ ЧИНЫ БОЛОТНОЙ (*Lathyrus palustris* L.) И ГОРОШКА МЫШИНОГО (*Vicia cracca* L.), ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В АРКТИЧЕСКОЙ ЯКУТИИ*Д.С. КАРЛОВ¹ ✉, П.В. ГУРО¹, А.Л. САЗАНОВА¹, И.Г. КУЗНЕЦОВА¹,
Н.Ю. ТИХОМИРОВА¹, Н.Н. ЛАЩИНСКИЙ², И.С. ПАВЛОВ³, А.А. БЕЛИМОВ¹,
В.И. САФРОНОВА¹

Формирование высокопродуктивных пастбищных фитоценозов, основу которых составляют бобовые растения, образующие азотфиксирующий симбиоз с клубеньковыми бактериями, — необходимое условие распространения и устойчивого роста численности травоядных сельскохозяйственных животных в условиях изменения климата и кардинальной перестройки растительных экосистем в Арктике. В то же время вопросы биоразнообразия клубеньковых бактерий на арктических территориях и эффективность их симбиотического взаимодействия с бобовыми растениями в настоящее время остаются в России практически не изученными. В настоящей работе впервые описаны 12 штаммов, изолированных из клубеньков чины болотной и горошка мышиного, произрастающих в Арктической Якутии: изучено их таксономическое положение, а также показана способность формировать эффективный симбиоз как с традиционными бобовыми культурами, так и с дикорастущими растениями, которые более адаптированы к условиям Крайнего Севера и могут использоваться для создания высокопродуктивных пастбищных фитоценозов. Целью работы было изучение генетического разнообразия ризобияльных изолятов из популяций арктических дикорастущих бобовых растений *Lathyrus palustris* L. и *Vicia cracca* L., а также оценка их способности формировать азотфиксирующие клубеньки на корнях кормовых пастбищных бобовых культур в условиях микровегетационного опыта. Корневые клубеньки дикорастущих популяций бобовых растений *V. cracca* и *L. palustris* были собраны в 2021 году на острове Самойловский и в поселке Тикси в ходе российско-немецкой экспедиции в дельту реки Лены. Ризобияльные штаммы из клубеньков бобовых выделяли по стандартной методике с использованием маннитно-дрожжевой питательной среды YMA. Таксономическое положение 12 изолятов определяли посредством секвенирования 16S рДНК (*rrs*). Для постановки микровегетационных опытов (МВО) использовали семена *V. cracca*, *V. sativa*, *L. sativus* и *L. pratensis*. Растения культивировали в стерильных стеклянных сосудах объемом 300 мл, содержащих 50 мл агаризованной среды Красильникова-Кореньяко. Проростки были инокулированы суспензиями индивидуальных штаммов в количестве 10^6 клеток/сосуд. В качестве положительного контроля использовали коммерческие штаммы *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM2802, RCAM2806 и RCAM0626 из Сетевой биоресурсной коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства (ФГБНУ ВНИИСХМ, г. Санкт-Петербург). Неинокулированные растения служили отрицательным контролем. По окончании культивирования проводили подсчет и описание клубеньков, образовавшихся на корнях растений. Азотфиксирующую активность клубеньков определяли ацетиленовым методом с помощью газового хроматографа GC-2014 («Shimadzu», Япония). В условиях отдельного МВО семена *V. cracca* и *L. pratensis* дополнительно были инокулированы почвенной вытяжкой из образца, отобранного с острова Котельный (Новосибирские о-ва, Арктическая Якутия). Всего из корневых клубеньков популяций *L. palustris* и *V. cracca* было выделено 12 ризобияльных изолятов, отнесенных к родам *Rhizobium*, *Mesorhizobium* и *Bosea*. Штаммы *Mesorhizobium* sp. 33-3/1 и 32-2/1 были выделены только из популяций, произрастающих в пос. Тикси. Штамм *Rhizobium* sp. 32-5/1 показал низкое сходство по гену *rrs* с ближайшим типовым штаммом (менее 98,0 %), что позволяет предположить его принадлежность к новому виду микроорганизмов. При постановке МВО клубеньки формировались только в вариантах инокуляции штаммами *Rhizobium* sp. 19-1/1, 20-1/1, 33-1/1 и *Mesorhizobium* sp. 32-2/1. Штамм *Rhizobium* sp. 19-1/1 формировал неактивные клубеньки на корнях сразу трех видов бобовых (кроме *V. cracca*). Штамм *Rhizobium* sp. 20-1/1 при инокуляции *V. cracca* сформировал большее число клубеньков и показал более высокую азотфиксирующую активность по сравнению с коммерческим штаммом для обработки вики посевной *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM0626, однако различия по числу клубеньков между вариантами опыта были недостоверными из-за значительной вариации параметра.

Ключевые слова: Арктическая Якутия, дельта реки Лены, бобовые растения, *Lathyrus palustris*, *Vicia cracca*, азотфиксирующие клубеньковые бактерии.

* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-76-10042).

Глобальное изменение климата сопровождается существенной перестройкой всей арктической экосистемы, что связано с активным продвижением растительных сообществ на Север, заполнением новых экологических ниш и вытеснением аборигенной флоры (1, 2). На таких территориях могут формироваться пастбищные фитоценозы, существенную часть которых составляют бобовые растения, вступающие в симбиотические взаимоотношения с азотфиксирующими клубеньковыми бактериями (ризобиями). Эта взаимовыгодная стратегия позволяет бобовым осваивать новые территории благодаря широкой экологической пластичности и устойчивости к стрессовым факторам окружающей среды, в том числе низкому содержанию азота в почве. Бобовые растения — основной источник белка как для травоядных сельскохозяйственных животных, так и для диких северных оленей и овцебыков (3, 4).

Первое и единственное описание клубеньковых бактерий, выделенных из корневых клубеньков дикорастущих бобовых растений *Oxytropis nigrescens* (Pall.) Fisch., *O. maydelliana* Trautv., *Astragalus alpinus* L., *A. umbellatus* Bunge и *Hedysarum obscurum* L., которые произрастают в азиатской части Арктики в тундре Чукотского полуострова, о-ва Колючин и Врангеля, приводится в работе А.Е. Крисс с соавт. (5). Авторы изолировали 8 бактериальных штаммов, не способных в вегетационных опытах образовывать клубеньки на корнях сельскохозяйственных бобовых растений клевера, донника, люцерны, гороха и вики. В то же время наблюдалась способность некоторых штаммов образовывать клубеньки на бобовых растениях *H. alpinum* L., *H. sibiricum* Poig. и *A. trautvetteri* Bunge., при этом азотфиксирующая активность клубеньков не изучалась.

Виды чина болотная *Lathyrus palustris* L. и горошек мышиный *Vicia cracca* L. относятся к трибе виковые *Vicieae* (Adans.) Bronn семейства *Fabaceae*. Многие представители родов *Lathyrus* и *Vicia* служат ценными кормовыми пастбищными и сенокосными культурами, входящим в рацион питания крупного и мелкого рогатого скота, лошадей (6, 7), а также диких травоядных животных Центральной Якутии (8). В частности, вид *L. palustris* обладает высокими кормовыми достоинствами и считается особенно перспективной культурой для введения в пастбищные агрофитоценозы Восточной Сибири (6, 9), тогда как *V. cracca* входит в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию, и активно культивируется в качестве ценной кормовой травы в пастбищных и сенокосных фитоценозах (10).

Основные микросимбионты бобовых растений родов *Vicia* и *Lathyrus* — штаммы вида *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (11-13). Помимо них, из корневых клубеньков различных видов *Vicia* и *Lathyrus* выделяются также не типичные для этих родов симбионты, родственные как другим видам *Rhizobium* (14, 15), так и представителям рода *Phyllobacterium* (11). Было показано, что штамм *Mesorhizobium alhagi* CCNWXJ12-2^T, выделенный из верблюжьей колючки *Alhagi sparsifolia*, произрастающей в северо-восточном Китае, был способен формировать клубеньки на корнях *V. cracca* (16).

Арктические ризобии представляют интерес для изучения эволюционного развития азотфиксирующих бактерий и их адаптации к низким температурам, а также дают возможность анализировать функциональные отношения между ризобиями и бобовыми растениями в изолированных аборигенных популяциях Севера (17). Перспективно использование арктических штаммов клубеньковых бактерий при производстве микробных препаратов с целью создания высокопродуктивных пастбищных фитоценозов в

условиях Заполярья (18). Однако вопросы биоразнообразия клубеньковых бактерий арктических территорий и эффективность их симбиотического взаимодействия с бобовыми растениями остаются в России практически не изученными.

В настоящей работе впервые описаны 12 штаммов, изолированных из клубеньков чины болотной и горошка мышиноного, произрастающих в Арктической Якутии: изучено их таксономическое положение, а также показана способность формировать эффективный симбиоз как с традиционными бобовыми культурами, так и с дикорастущими растениями, которые более адаптированы к условиям Крайнего Севера и могут использоваться для создания высокопродуктивных пастбищных фитоценозов.

Целью работы было изучение генетического разнообразия ризобияльных изолятов из популяций арктических дикорастущих бобовых растений *Lathyrus palustris* L. и *Vicia cracca* L., а также оценка их способности формировать азотфиксирующие клубеньки на корнях кормовых пастбищных бобовых культур в условиях микровегетационного опыта.

Методика. Корневые клубеньки дикорастущих популяций бобовых растений *V. cracca* и *L. palustris* были собраны в 2021 году на острове Самойловский и в поселке Тикси в ходе российско-немецкой экспедиции в дельту реки Лены (Арктическая Якутия).

Ризобияльные штаммы выделяли по стандартной методике с использованием маннитно-дрожжевой питательной среды YMA (19) после стерилизации клубеньков в течение 1 мин в 96 % этаноле. Выделение гДНК из чистых культур осуществляли с помощью наборов DNeasy Blood & Tissue kit («QIAGEN», Германия) и Monarch® («New England Biolabs», США). Первичную идентификацию штаммов проводили методом ПЦР с последующим секвенированием последовательностей маркерного гена 16S рРНК. Для амплификации использовали пары праймеров fD1 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' и rD1 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3' (20). Условия ПЦР для амплификации гена 16S рРНК были следующими: 3 мин 30 с при 95 °С (первичная денатурация); 1 мин 10 с при 94 °С (денатурация), 40 с при 56 °С (отжиг праймеров), 2 мин 10 с при 72 °С (элонгация) (35 циклов); 6 мин 10 с при 72 °С (финальная элонгация). Состав реакционной смеси для ПЦР: 38 мкл milli-Q H₂O («Евроген», Россия), 5 мкл буфера («Хеликон», Россия), 5 мкл набора dNTP («Promega», США), по 0,5 мкл праймеров («Евроген», Россия), 0,5 мкл Taq-полимеразы («Хеликон», Россия) и 1 мкл (50-100 нг) мДНК. Амплификацию проводили на приборе T100 Thermal Cycler («Bio-Rad», США). Количество ДНК оценивали визуально с помощью электрофореза в 1,0 % агарозном геле в 0,5× TAE-буфере с использованием маркера молекулярной массы MassRuler («Fermentas», Литва). Очистку ПЦР-продукта из агарозного геля осуществляли с помощью набора Cleanup S-Cap («Евроген», Россия). Очищенную ДНК секвенировали на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xl («Life Technologies», США) на базе Центра коллективного пользования «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» Всероссийского НИИ сельскохозяйственной микробиологии (ЦКП ГТПиКБ ФГБНУ ВНИИСХМ).

Полученные последовательности ДНК анализировали с помощью программы Chromas Lite 2.6.4 (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>). Для множественного выравнивания и сравнения нуклеотидных последовательностей использовали программу ClustalOmega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Поиск последовательностей близкородственных типовых штаммов осуществляли в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Нуклеотидные последовательности депонированы в базу данных GenBank под

номерами OQ685989-OQ686000.

Для постановки микровегетационных опытов (МВО) семена *V. cracca*, *V. sativa*, *L. sativus* и *L. pratensis* скарифицировали и поверхностно стерилизовали посредством обработки в 98 % H_2SO_4 в течение 10 мин, тщательно промывали стерильной водопроводной водой и проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри при 25 °С в темноте в течение 3-5 сут (в зависимости от вида растений). Семена *V. sativa* и *L. sativus* были любезно предоставлены сотрудниками ФГБНУ Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР, г. Санкт-Петербург). Вид *L. pratensis* был использован вместо *L. palustris* в качестве объекта инокуляции ввиду отсутствия семян.

Растения культивировали в стерильных стеклянных сосудах объемом 300 мл, содержащих 50 мл агаризованной среды Красильникова-Кореньяко следующего состава: K_2HPO_4 — 1,0 г/л; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 1,0 г/л; $Ca_3(PO_4)_2$ — 0,2 г/л; $FeSO_4$ — 0,02 г/л; смесь микроэлементов по М.В. Федорову, включая H_3BO_3 — 0,05 г/л; $(NH_4)_2MoO_4$ — 0,05 г/л; KCl — 0,005 г/л; $NaBr$ — 0,005 г/л; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,003 г/л; $MnSO_4$ — 0,002 г/л). Каждый МВО проводили в трех повторностях (3 сосуда по 1 проростку на каждый вариант инокуляции).

Проростки были инокулированы суспензиями индивидуальных штаммов в количестве 10^6 клеток/сосуд. В качестве положительного контроля использовали коммерческие штаммы *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM2802, RCAM2806 и RCAM0626 из Сетевой биоресурсной коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства (ФГБНУ ВНИИСХМ, г. Санкт-Петербург). Неинокулированные растения служили отрицательным контролем. Растения выращивали в фитотроне при 18-22 °С в течение 30 сут при относительной влажности 50 % и четырехуровневом режиме освещения/температуры: ночь (18 °С, 8 ч), утро ($200 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, 20 °С, 2 ч), день ($400 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, 23 °С, 12 ч), вечер ($200 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, 20 °С, 2 ч). Освещение осуществлялось лампами L36W/77 FLUORA («Osram», Германия).

По окончании культивирования проводили подсчет и описание клубеньков, образовавшихся на корнях растений. Азотфиксирующую активность клубеньков определяли ацетиленовым методом с помощью газового хроматографа GC-2014 («Shimadzu», Япония).

В условиях отдельного МВО семена *V. cracca* и *L. pratensis* дополнительно были инокулированы почвенной вытяжкой из образца, отобранного с острова Котельный (Новосибирские острова, Арктическая Якутия). Для приготовления почвенной вытяжки 1 г образца добавляли в стерильную колбу с 50 мл жидкой среды Красильникова-Кореньяко. Колбу помещали на качалку и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Проростки инокулировали почвенной вытяжкой из расчета 1 мл вытяжки на сосуд.

Статистический анализ выполняли с использованием программы STATISTICA 10 («StatSoft, Inc.», США). Для каждого варианта инокуляции были подсчитаны средние значения (M) и стандартные отклонения ($\pm SD$). Для оценки значимости различий между средними величинами использовали однофакторный дисперсионный анализ и критерий НСР Фишера.

Результаты. Остров Самойловский (72°22'00" с.ш., 126°30'01" в.д.) расположен в южной части дельты реки Лены в подзоне типичных тундр (рис. 1). В геоморфологическом отношении остров отчетливо делится на две части, различные по возрасту и генезису. На две трети остров занимает

поверхность первой террасы, а одну треть в западной части острова составляет поверхность высокой поймы, подверженной сезонным подтоплениям речными водами (21). Поселок Тикси ($71^{\circ}38'12''$ с.ш., $128^{\circ}52'04''$ в.д.) расположен на берегу одноименной бухты, приуроченной к южной части моря Лаптевых (см. рис. 1). Преобладающие элементы рельефа окрестностей поселка — невысокие сопки и межгорные заболоченные седловины. Основу растительного покрова составляют различные варианты тундр и низинные мелкозалежные болота. Почвы мерзлотные, щебнисто-каменистые. Флора горная, умеренно-арктическая (22).



Рис. 1. Места сбора растений *Vicia cracca* L. и *Lathyrus palustris* L. на о. Самойловский (дельта р. Лены) и пос. Тикси (отмечены белыми точками).

пуляции *V. cracca* и *L. palustris* произрастают западной части острова, сложенной песками и подверженной сезонным подтоплениям речным половодьем (24).



Рис. 2. Растения *Lathyrus palustris* L. (а) и *Vicia cracca* L. (б), произрастающие на о. Самойловский (дельта р. Лены) (фото И.А. Алехиной).

В результате анализа гена *rrs* изоляты были отнесены к родам *Rhizobium* (сем. *Rhizobiaceae*), *Mesorhizobium* (сем. *Phyllobacteriaceae*) и *Bosea* (сем. *Boseaceae*) порядка *Rhizobiales* (*Hyphomicrobiales*). Отметим, что из клубеньков популяции *L. palustris*, произрастающей на о. Самойловский, были выделены только представители *Rhizobium*, тогда как популяция из пос. Тикси оказалась представлена более широким составом микросимбионтов (*Rhizobium*, *Mesorhizobium* и *Bosea*), что, по-видимому, связано с различными почвенно-климатическими особенностями этих районов (см. табл. 1).

Изоляты из клубеньков *L. palustris* (19-1/1, 19-3/1, 19-4/1, 19-5/1,

О находках бореальных видов чины болотной *Lathyrus palustris* L. и горошка мышиноного *Vicia cracca* L. на территории пос. Тикси сообщалось относительно недавно (23). Вид *V. cracca* (рис. 2, Б) на острове Самойловский впервые был обнаружен Н.Н. Лашинским (устное сообщение) в 2017 году, а растения *L. palustris* (рис. 2, А) — им же во время российско-немецкой экспедиции в дельту реки Лены в 2021 году. По-

преимущественно в северо-

Из корневых клубеньков *L. palustris* и *V. cracca* всего было выделено соответственно 8 и 4 ризобийных изолята (табл. 1): из клубеньков двух популяций *L. palustris* — по 4 изолята, из клубеньков популяций *V. cracca* — по 2. Большинство изолятов образовывали колонии на 3-и-4-е сут, исключение составил штамма 33-5/1, формировавший колонии на 5-е сут. На осно-

33-1/1) и *V. cracca* (20-1/1) показали 100 % сходство *rrs* гена сразу к четырем типовым штаммам: *R. leguminosarum* bv. *viciae* LMG 14904^T, *R. anhuiense* ССВАУ 23252^T, *R. sophorae* LMG 27901^T и *R. laguerreae* FB206^T (см. табл. 1). Как результат, полученные изоляты не были идентифицированы до вида. Для уточнения их видовой принадлежности необходимо секвенирование и анализ генов «домашнего хозяйства» (*recA*, *atpD*, *dnaK*, *gyrB* и *rpoB*).

Известно, что штамм *R. leguminosarum* bv. *viciae* LMG 14904^T способен образовывать эффективный симбиоз с бобовыми растениями из родов *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus*, *Lens* и *Vavilovia* из трибы *Fabeae* (25, 26). Штамм *R. anhuiense* ССВАУ 23252^T был выделен из бобового растения *V. faba*, произрастающего в Китае. Он образовывал азотфиксирующие клубеньки на корнях *V. faba* и *Pisum sativum* (27). В опытах по кросс-нодуляции этот штамм формировал неэффективный симбиоз с *Phaseolus vulgaris* и был не способен образовывать клубеньки на пищевых и кормовых бобовых культурах *Glycine max*, *Arachis hypogaea*, *Medicago sativa*, *Trifolium repens*, *Lablab purpureus* (27).

1. Изоляты, выделенные из клубеньков *Lathyrus palustris* L. и *Vicia cracca* L., собранных на о. Самойловский (дельта реки Лены) и в пос. Тикси (2021 год)

Место сбора растений	№ штамма	Сходство гена <i>rrs</i> , %	Ближайший типовой штамм	Результат идентификации
<i>Lathyrus palustris</i> L.				
о. Самойловский	19-1/1	100	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> LMG 14904, <i>R. sophorae</i> LMG 27901, <i>R. anhuiense</i> ССВАУ 23252, <i>R. laguerreae</i> FB206	<i>Rhizobium</i> sp.
	19-3/1			
	19-4/1			
	19-5/1			
пос. Тикси	33-1/1	100	<i>Mesorhizobium norvegicum</i> 10.2.2, <i>M. loti</i> LMG 6125	<i>Mesorhizobium</i> sp.
	33-3/1			
	33-4/1	99,72	<i>Bosea lathyri</i> R-46060	<i>Bosea lathyri</i>
	33-5/1	99,21	<i>B. lathyri</i> R-46060	<i>Bosea</i> sp.
<i>Vicia cracca</i> L.				
о. Самойловский	20-1/1	100	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> LMG 14904, <i>R. sophorae</i> LMG 27901, <i>R. anhuiense</i> ССВАУ 23252, <i>R. laguerreae</i> FB206	<i>Rhizobium</i> sp.
	20-5/1	99,21	<i>B. lathyri</i> R-46060	<i>Bosea</i> sp.
пос. Тикси	32-2/1	100	<i>M. norvegicum</i> 10.2.2, <i>M. loti</i> LMG 6125	<i>Mesorhizobium</i> sp.
	32-5/1	97,85	<i>R. giardinii</i> H152	<i>Rhizobium</i> sp.

Известно, что представители вида *R. anhuiense* служат основными микросимбионтами вида *Lathyrus maritimus*, произрастающего вдоль морской береговой линии в Китае (15). Штамм *R. sophorae* LMG 27901^T был выделен из клубенька лекарственного бобового *Sophora flavescens*, также отобранного в Китае (28). Было показано, что штамм LMG 27901^T способен формировать активные клубеньки на корнях *S. flavescens* и *P. vulgaris*, тогда как другие штаммы *R. sophorae* могли образовывать эффективный симбиоз с растениями *V. sativa* и *P. sativum*, произрастающими в Северном Китае (29). Штамм *R. laguerreae* FB206^T был выделен из эффективного клубенька *V. faba* в Тунисе (30), причем представители этого вида ризобий служат эффективными симбионтами многих видов *Pisum*, *Vicia*, *Lens* и *Phaseolus*, встречающихся в различных регионах мира (31-34), и обладают рост-стимулирующими свойствами, улучшая продуктивность сельскохозяйственных культур (35, 36).

Изоляты 33-3/1 и 32-2/1 были выделены соответственно из популяций *L. palustris* и *V. cracca*, произрастающих в пос. Тикси. Изоляты показали 100 % сходство *rrs* гена с типовыми штаммами *Mesorhizobium norvegicum* 10.2.2^T и *M. loti* LMG 6125^T, выделенными из корневых клубеньков бобового растения *Lotus corniculatus*, произрастающего соответ-

ственно в Новой Зеландии (37) и Норвегии (38). Отметим, что из популяций *L. palustris* и *V. cracca* с о. Самойловский бактерий рода *Mesorhizobium* выделить не удалось.

Изоляты 33-4/1, 33-5/1 и 20-5/1 показали наибольшее сходство *rrs* гена (33-4/1 — 99,72 %; 33-5/1 и 20-5/1 — 99,21 %) с типовым штаммом *B. lathyri* R-46060^T, выделенным из *Lathyrus latifolius*, произрастающего в Бельгии (39). Изоляты, родственные *Bosea*, имели разное происхождение: штаммы 33-4/1 и 33-5/1 были выделены из растений *L. palustris* в пос. Тикси, тогда как изолят 20-5/1 выделили из *V. cracca* на о. Самойловский. Следует отметить, что род *Bosea* представлен в настоящее время 12 видами, из которых только 6 видов (*B. lupini*, *B. lathyri*, *B. robiniae*, *B. caraganae*, *B. vaviloviae* и *B. spartocytisi*) выделены из клубеньков бобовых растений родов *Lupinus*, *Lathyrus*, *Robinia*, *Caragana*, *Vavilovia* и *Spartocytisus* (39-42). Однако способность этих штаммов к самостоятельному формированию клубеньков до сих пор не описана. Штамм *Rhizobium* sp. 32-5/1 показал низкое сходство по гену *rrs* с ближайшим типовым штаммом (менее 98,0 %), что позволяет предположить его принадлежность к новым видам микроорганизмов.

2. Эффект инокуляции растений *Lathyrus palustris* L. и *Vicia cracca* L. коммерческими штаммами *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM2806, RCAM0626 и арктическими изолятами в условиях стерильного микроvegetационного опыта ($n = 3$, $M \pm SD$)

Вариант инокуляции	Число клубеньков, шт/сосуд	Ацетиленредуктазная активность, мкмоль $C_2H_4 \cdot \text{сосуд}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$
<i>Lathyrus palustris</i> L.		
<i>R. leguminosarum</i> RCAM2806	5,5±2,1 ^a	0,37±0,08
Без инокуляции	0	0
<i>Rhizobium</i> sp. 19-1/1*	2,6±1,1 ^a	0
<i>Rhizobium</i> sp. 20-1/1	0	н/о
<i>Bosea</i> sp. 20-5/1	0	н/о
<i>Mesorhizobium</i> sp. 32-2/1	0	н/о
<i>Rhizobium</i> sp. 32-5/1	0	н/о
<i>Rhizobium</i> sp. 33-1/1*	4,0±2,0 ^a	0
<i>Mesorhizobium</i> sp. 33-3/1*	0	н/о
<i>Bosea lathyri</i> 33-4/1*	0	н/о
<i>Bosea</i> sp. 33-5/1*	0	н/о
<i>Vicia cracca</i> L.		
<i>R. leguminosarum</i> RCAM0626	5,3±1,5 ^a	0,05±0,01 ^a
Без инокуляции	0	0
<i>Rhizobium</i> sp. 19-1/1*	0	н/о
<i>Rhizobium</i> sp. 20-1/1	7,3±0,5 ^a	0,68±0,35 ^b
<i>Bosea</i> sp. 20-5/1	0	н/о
<i>Mesorhizobium</i> sp. 32-2/1	КО	0
<i>Rhizobium</i> sp. 32-5/1	0	н/о
<i>Rhizobium</i> sp. 33-1/1*	КО	0
<i>Mesorhizobium</i> sp. 33-3/1*	0	н/о
<i>Bosea lathyri</i> 33-4/1*	0	н/о
<i>Bosea</i> sp. 33-5/1*	0	н/о

П р и м е ч а н и е. КО — клубенькоподобные образования, н/о — не определялось. Семена *L. pratensis* были собраны в Иркутской области, семена *V. cracca* — на о. Самойловский (дельта р. Лены). Звездочкой (*) отмечены штаммы, изолированные из клубеньков *L. palustris*, остальные штаммы выделены из *V. cracca*. ^a, ^b Разными латинскими буквами отмечены варианты, различия между которыми статистически значимы (критерий НСР Фишера, $p < 0,05$).

Способность изолятов нодулировать бобовые растения изучали в условиях двух стерильных МВО с использованием 9 ризобияльных штаммов разного таксономического положения (три рода — *Rhizobium*, *Mesorhizobium* и *Bosea*) и 4 видов сельскохозяйственных кормовых бобовых растений: *V. cracca*, *V. sativa*, *L. sativus* и *L. pratensis* (табл. 2, 3). В первом МВО клубеньки на *L. pratensis* образовались только при инокуляции штаммами *Rhizobium* sp. 19-1/1 и 33-1/1, хотя симбиоз в обоих случаях не был азот-

фиксирующим (см. табл. 2). Клубеньки на *V. cracca* образовались только в варианте с инокуляцией штаммом *Rhizobium* sp. 20-1/1, который сформировал эффективный симбиоз с более высокой азотфиксирующей активностью, чем при инокуляции коммерческим штаммом *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM0626 (различия между вариантами опыта по параметру азотфиксации были достоверны, $p < 0,05$). В вариантах инокуляции *V. cracca* штаммами *Mesorhizobium* sp. 32-2/1 и *Rhizobium* sp. 33-1/1 на корнях растений были обнаружены опухолевидные клубенькоподобные образования (см. табл. 2).

3. Эффект инокуляции растений *Lathyrus sativus* L. и *Vicia sativa* L. коммерческими штаммами *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM2806, RCAM0626 и арктическими изолятами в условиях стерильного микровегетационного опыта ($n = 3, M \pm SD$)

Вариант инокуляции	Число клубеньков, шт/сосуд	Ацетиленредуктазная активность, мкмоль $C_2H_4 \cdot \text{сосуд}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$
<i>Lathyrus sativus</i> L.		
<i>R. leguminosarum</i> RCAM2802	21,0±2,8 ^a	5,20±0,03
Без инокуляции	0	0
<i>Rhizobium</i> sp. 19-1/1*	29,3±9,5 ^a	0
<i>Rhizobium</i> sp. 20-1/1	0	н/о
<i>Bosea</i> sp. 20-5/1	0	н/о
<i>Mesorhizobium</i> sp. 32-2/1	0	н/о
<i>Rhizobium</i> sp. 32-5/1	0	н/о
<i>Rhizobium</i> sp. 33-1/1*	0	н/о
<i>Mesorhizobium</i> sp. 33-3/1*	0	н/о
<i>Bosea lathyri</i> 33-4/1*	0	н/о
<i>Bosea</i> sp. 33-5/1*	0	н/о
<i>Vicia sativa</i> L.		
<i>R. leguminosarum</i> RCAM0626	110,0±41,0 ^{ab}	3,70±2,00 ^a
Без инокуляции	0	0
<i>Rhizobium</i> sp. 19-1/1*	122,0±13,0 ^b	0
<i>Rhizobium</i> sp. 20-1/1	0	0
<i>Bosea</i> sp. 20-5/1	0	н/о
<i>Mesorhizobium</i> sp. 32-2/1	68,0±30,0 ^a	0
<i>Rhizobium</i> sp. 32-5/1	0	н/о
<i>Rhizobium</i> sp. 33-1/1*	107,0±8,0 ^{ab}	0,20±0,10 ^b
<i>Mesorhizobium</i> sp. 33-3/1*	0	н/о
<i>Bosea lathyri</i> 33-4/1*	0	н/о
<i>Bosea</i> sp. 33-5/1*	0	н/о

Примечание. н/о — не определялось. Семена *L. pratensis* были собраны в Иркутской области, семена *V. cracca* — на о. Самойловский (дельта р. Лены). Звездочкой (*) отмечены штаммы, изолированные из клубеньков *L. palustris*, остальные штаммы выделены из *V. cracca*.

^{a, b} Разными латинскими буквами отмечены варианты, различия между которыми статистически значимы (критерий НСР Фишера, $p < 0,05$).

Во втором МВО при инокуляции *L. sativus* штаммом *Rhizobium* sp. 19-1/1 на корнях растений были сформированы округлые неактивные клубеньки, как и в случае с *L. pratensis* (см. табл. 2, 3). Клубеньки на *V. sativa* образовались в трех вариантах инокуляции, но только в варианте со штаммом *Rhizobium* sp. 33-1/1 симбиоз был эффективным: показана незначительная азотфиксирующая активность по сравнению с коммерческим штаммом *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM0626 (см. табл. 3). Интересно, что штаммы *Mesorhizobium* sp. 32-2/1 и *Rhizobium* sp. 33-1/1, выделенные соответственно из клубеньков *V. cracca* и *L. palustris*, образовывали на корнях *V. cracca* только клубенькоподобные структуры, тогда как на корнях *V. sativa* оба штамма формировали детерминированный тип клубеньков округлой формы. Причина этого, вероятно, связана с достаточно высокой степенью специфичности растения-хозяина к микросимбионту. Образовавшиеся клубеньки были в основном округлые, белые, неэффективные, детерминированного типа, за исключением вариантов инокуляции *V. cracca* с изолятом *Rhizobium* sp. 20-1/1 и *V. sativa* с изолятом *Rhizobium* sp. 33-1/1, где часть

сформировавшихся клубеньков отличалась продолговатой формой и розоватым оттенком, свидетельствующим об их азотфиксирующей активности.

В результате инокуляции растений *V. cracca* и *L. pratensis* почвенной вытяжкой из образца, отобранного на о. Котельный, клубеньки на корнях обнаружены не были, что, скорее всего, связано с отсутствием в почве соответствующих микросимбионтов, поскольку в настоящее время присутствие бобовых на о. Котельный не выявлено.

Таким образом, из клубеньков арктических дикорастущих бобовых растений *L. palustris* и *V. cracca* было выделено 12 ризобияльных изолятов, относящихся к родам *Rhizobium*, *Mesorhizobium* и *Bosea*. Большинство изолятов относилось к роду *Rhizobium*. Штаммы *Mesorhizobium* sp. 33-3/1 и 32-2/1 были выделены соответственно из популяций *Lathyrus palustris* и *Vicia cracca*, произрастающих в пос. Тикси, тогда как из популяций на о. Самойловский бактерии этого рода выделить не удалось. Присутствие вида *L. palustris* на о. Самойловский было описано впервые. Штамм *Rhizobium* sp. 32-5/1 показал низкое сходство по гену *rrs* с ближайшим типовым штаммом (менее 98,0 %), что позволяет предположить его принадлежность к новым видам микроорганизмов. При постановке микровегетационных опытов для изучения кросс-нодуляции с участием сельскохозяйственных кормовых бобовых растений *Vicia cracca*, *Vicia sativa*, *Lathyrus sativus* и *Lathyrus pratensis* клубеньки формировались только в вариантах инокуляции штаммами *Rhizobium* sp. 19-1/1, 20-1/1, 33-1/1 и *Mesorhizobium* sp. 32-2/1. Штамм *Rhizobium* sp. 19-1/1 был единственным, который формировал неэффективные клубеньки на корнях сразу трех видов бобовых, за исключением варианта с *V. cracca*, что может свидетельствовать о его широкой специфичности по отношению к различным родам и видам растений-хозяев. Отметим, что штамм *Rhizobium* sp. 20-1/1 в варианте инокуляции растений *V. cracca* сформировал большее число клубеньков (различия между вариантами опыта не были достоверными из-за значительной вариации этого параметра) и показал более высокую азотфиксирующую активность по сравнению с коммерческим штаммом *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM0626, что делает его перспективным для разработки новых высокоэффективных микробных препаратов с целью создания продуктивных пастбищных фитонозов на арктических территориях России. Для дальнейшего изучения хозяйской специфичности и симбиотической эффективности полученных штаммов будут проведены микровегетационные опыты с расширенной выборкой кормовых сельскохозяйственных и дикорастущих арктических бобовых растений.

Выражаем благодарность руководству и координаторам экспедиции «Лена 2021» за организацию и проведение экспедиции в район дельты реки Лены. Искренне благодарим Сергея Александровича Правкина (АНИИ) за помощь в сборе и транспортировке семян бобовых культур. Выражаем благодарность коллективу научно-исследовательской станции «Остров Самойловской» и лично Федору Виссарионовичу Селяхову за предоставленный транспорт. Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

¹ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: deniskarlov23@gmail.com ✉, polinaguro@gmail.com,
anna_sazanova@mail.ru, kuznetsova_rina@mail.ru,
n_tikhomirova@rambler.ru, belimov@rambler.ru, v.safronova@rambler.ru;

²ФГБУН Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,

Поступила в редакцию
28 февраля 2023 года

STUDY OF THE GENETIC DIVERSITY AND SYMBIOTIC EFFICIENCY OF MICROSymbionTS ISOLATED FROM *Lathyrus palustris* L. AND *Vicia cracca* L. GROWING IN ARCTIC YAKUTIA

D.S. Karlov¹ ✉, P.V. Guro¹, A.L. Sazanova¹, I.G. Kuznetsova¹, N.Yu. Tikhomirova¹,
N.N. Laschinsky², I.S. Pavlov³, A.A. Belimov¹, V.I. Safronova¹

¹All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail deniskarlov23@gmail.com (✉ corresponding author), polinaguro@gmail.com, anna_sazanova@mail.ru, kuznetsova_rina@mail.ru, n_tikhomirova@rambler.ru, belimov@rambler.ru, v.safronova@rambler.ru;

²Central Siberian Botanical Garden, 101, ul. Zolotodolinskaya, Novosibirsk, 630090 Russia, e-mail nick_lash@mail.ru;

³Academy of Sciences of Republic of Sakha (Yakutia), 33, prospect Lenina, Yakutsk, 677007 Russia, e-mail pavlovinn@mail.ru

ORCID:

Karlov D.S. orcid.org/0000-0002-9030-8820

Laschinsky N.N. orcid.org/0000-0002-4196-7619

Guro P.V. orcid.org/0000-0001-5754-6926

Pavlov I.S. orcid.org/0000-0002-4417-1800

Sazanova A.L. orcid.org/0000-0003-0379-6975

Belimov A.A. orcid.org/0000-0002-9936-8678

Kuznetsova I.G. orcid.org/0000-0003-0260-7677

Safronova V.I. orcid.org/0000-0003-4510-1772

Tikhomirova N.Yu. orcid.org/0000-0001-8530-6698

Acknowledgements:

We would like to express our gratitude to the leadership and coordinators of the Lena 2021 expedition for organizing and conducting the expedition to the Lena Delta region. We sincerely thank Sergey Alexandrovich Pravkin (AARI) for his help in collecting and transporting seeds of legumes. We express our gratitude to the staff of the research station "Samoilovskaya Island" and personally to Fedor Vissanionovich Selyakhov for the provided transport.

The work was carried out using the equipment of the Core Centrum "Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology" at the All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology.

Supported financially by the Russian Science Foundation (project no. 20-76-10042)

The authors declare no conflict of interests

Final revision received February 28, 2023

doi: 10.15389/agrobiol.2023.3.403eng

Accepted March 31, 2023

Abstract

The formation of highly productive pasture phytocenoses, based on legumes that form nitrogen-fixing symbiosis with nodule bacteria, is a necessary condition for the spread and sustainable growth of herbivorous farm animals under climate change and radical restructuring of plant ecosystems in the Arctic. At the same time, the issues of biodiversity of nodule bacteria of Arctic territories and the efficiency of their symbiotic interaction with legumes are currently almost unstudied in Russia. In this work 12 strains isolated from *Lathyrus palustris* and *Vicia cracca* nodules growing in Arctic Yakutia were described for the first time. The taxonomic position of the strains was studied and their ability to form an effective symbiosis with both traditional legumes and wild plants, which are more adapted to the conditions of the Far North and can be used to create highly productive pasture phytocenoses, was shown. The aim of the work was to isolate and study the genetic diversity of nodule bacteria of various populations of wild legume plants of *Lathyrus palustris* L. and *Vicia cracca* L. growing in Arctic Yakutia. The ability of the obtained isolates to form nitrogen-fixing nodules on the roots of different species of forage legume crops was evaluated under the conditions of sterile test-tube experiments. Root nodules of *V. cracca* and *L. palustris* were collected on Samoilovsky Island and in the settlement of Tiksi during the Russian-German expedition to the Lena River Delta. Rhizobial strains from legume nodules were isolated according to the standard method using mannitol-yeast YMA nutrient media. The taxonomic position of 12 isolates was determined by 16S rDNA (*rrs*) sequencing. Seeds of *V. cracca*, *V. sativa*, *L. sativus*, and *L. pratensis* were used to set up of test-tube experiments. Plants were cultivated in sterile 300 ml glass vessels containing 50 ml of Krasilnikov-Korenyako agar medium. The seedlings were inoculated with suspensions of individual strains in the amount of 10⁶ cells/vessel. Commercial strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM2802, RCAM2806 and RCAM0626 from the Russian Collection of Agricultural Microorganisms (RCAM, ARRIAM, St. Petersburg) were used as a positive control. Uninoculated plants served as negative controls. The number of nodules formed on the plant roots was counted and described at the end of cultivation. The nitrogen-fixing activity of nodules was determined by the acetylene method using a GC-2014 gas chromatograph (Shimadzu, Japan). Seeds of *V. cracca* and *L. pratensis* were additionally inoculated under the conditions of a separate test-tube experiment with a soil extract from a sample taken from Kotelny Island

(Novosibirsk Islands, Arctic Yakutia). A total of twelve rhizobial isolates assigned to the genera *Rhizobium*, *Mesorhizobium* and *Bosea* were isolated from root nodules of *L. palustris* and *V. cracca* populations. Strains of *Mesorhizobium* sp. 33-3/1 and 32-2/1 were isolated only from populations growing in Tiksi. *Rhizobium* sp. 32-5/1 strain showed a low similarity of the *rrs* gene with the closest type strain (less than 98.0 %), which suggests it belonging to the new species of microorganisms. As a result of test-tube experiments, nodules were formed only in the inoculation variants with strains of *Rhizobium* sp. 19-1/1, 20-1/1, 33-1/1 and *Mesorhizobium* sp. 32-2/1. *Rhizobium* sp. 19-1/1 strain formed inactive nodules on the roots of three legume species, except *V. cracca*. *Rhizobium* sp. 20-1/1 strain in the inoculation variant with *V. cracca* formed a greater number of nodules and showed a higher level of nitrogen-fixing activity compared with the commercial strain *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM0626 for treatment of *V. sativa*, but the variants did not differ significantly from each other in the number of nodules.

Keywords: Arctic Yakutia, Lena River Delta, legumes, *Lathyrus palustris*, *Vicia cracca*, nitrogen-fixing nodule bacteria.

REFERENCES

1. Belonovskaya E.A., Tishkov A.A., Vaysfel'd M.A., Glazov P.M., Krenke-m. A.N., Morozova O.V., Pokrovskaya I.V., Tsarevskaya N.G., Tertitskiy G.M. *Izvestiya Rossiyskoy akademii nauk. Seriya geograficheskaya*, 2016, 3: 28-39 (doi: 10.15356/0373-2444-2016-3-28-39) (in Russ.).
2. Tishkov A.A., Belonovskaya E.A., Vaysfel'd M.A., Glazov P.M., Krenke A.N., Tertitskiy G.M. *Arktika: ekologiya i ekonomika*, 2018, 2(30): 31-44 (doi: 10.25283/2223-4594-2018-2-31-44) (in Russ.).
3. Parakhin N.V., Petrova S.N. *Vestnik agrarnoy nauki*, 2009, 3(18): 41-45 (in Russ.).
4. Pryadil'shchikova E.N., Kalabashkin P.N., Konovalova S.S. *Vladimirskiy zemledelets*, 2018, 1(83): 32-35 (doi: 10.24411/2225-2584-2018-00008) (in Russ.).
5. Kriss A.E., Korenyako A.I., Migulina V.M. *Mikrobiologiya*, 1941, 10(1): 61-71 (in Russ.).
6. Vishnyakova M.A., Burlyaeva M.O. The potential of economic value and the prospects for the use of Russian types of rank. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2006, 6: 85-97.
7. Vishnyakova M.A. Vetch species from Vavilov's institute collection — promising forages for cultivation in Russian Federation (a review). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2007, 42(4): 3-19.
8. Argunov A.V., Stepanova V.V. Struktura ratsionnoy sibirskoy kosuli v Yakutii. *Ekologiya*, 2011, 2: 144-147 (in Russ.).
9. *Kormovye rasteniya senokosov i pastbishch SSSR. Tom 2 /Pod redaktsiyey I.V. Larina [Forage plants of hayfields and pastures of the USSR. Volume 2. I.V. Larin (ed.)]. Leningrad, 1951 (in Russ.)*.
10. *Gosudarstvennyy reestr selektsionnykh dostizheniy, dopushchennykh k ispol'zovaniyu. Tom 1. Sorta rasteniy (ofitsial'noye izdaniye) [State register of selection achievements approved for use. Volume 1. Plant varieties (official edition)]. Moscow, 2021 (in Russ.)*.
11. Baymiev A.Kh., Ptitsyn K.G., Muldashev A.A., Baymiev A.Kh. *Ekologicheskaya genetika*, 2011, 9(2): 3-8 (in Russ.).
12. Ampomah O.Y., Huss-Danell K. Genetic diversity of rhizobia nodulating native *Vicia* spp. in Sweden. *Systematic and Applied Microbiology*, 2016, 39(3): 203-210 (doi: 10.1016/j.syapm.2016.02.002).
13. Villadas P.J., Lasa A.V., Martínez-Hidalgo P., Flores-Félix J.D., Martínez-Molina E., Toro N., Velázquez E., Fernández-López M. Analysis of rhizobial endosymbionts of *Vicia*, *Lathyrus* and *Trifolium* species used to maintain mountain firewalls in Sierra Nevada National Park (South Spain). *Systematic and Applied Microbiology*, 2017, 40(2): 92-101 (doi: 10.1016/j.syapm.2016.11.008).
14. Aoki S., Kondo T., Prévost D., Nakata S., Kajita T., Ito M. Genotypic and phenotypic diversity of rhizobia isolated from *Lathyrus japonicus* indigenous to Japan. *Systematic and Applied Microbiology*, 2010, 33(7): 383-397 (doi: 10.1016/j.syapm.2010.07.001).
15. Li Y., Wang E.T., Liu Y., Li X., Yu B., Ren C., Liu W., Li Y., Xie Z. *Rhizobium anhuiense* as the predominant microsymbionts of *Lathyrus maritimus* along the Shandong Peninsula seashore line. *Systematic and Applied Microbiology*, 2016, 39(6): 384-390 (doi: 10.1016/j.syapm.2016.07.001).
16. Chen W.M., Zhu W.F., Bontemps C., Young J.P.W., Wei G.H. *Mesorhizobium alhagi* sp. nov., isolated from wild *Alhagi sparsifolia* in north-western China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(4): 958-962 (doi: 10.1099/ijs.0.014043-0).
17. Caudry-Reznick S., Prevost D., Schulman H.M. Some properties of arctic rhizobia. *Archives of Microbiology*, 1986, 146(1): 12-18.
18. Ryabova O.V. *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka*, 2016, 1(50): 31-40 (in Russ.).
19. Novikova N., Safronova V. Transconjugants of *Agrobacterium radiobacter* harbouring sym genes of *Rhizobium galegae* can form an effective symbiosis with *Medicago sativa*. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 93(3): 261-268 (doi: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05107.x).
20. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for

- phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703 (doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991).
21. Lashchinskiy N.N. *Materialy Vserossiiskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Itogi i perspektivy geobotanicheskikh issledovaniy v Sibiri»* [Proc. Russian Conf. «Results and prospects of geobotanical research in Siberia»]. Novosibirsk, 2019: 64-65 (in Russ.).
 22. Sekretareva N.A., Sytin A.K. *Botanicheskiy zhurnal*, 2006, 91(1): 3-22 (in Russ.).
 23. Nikolin E.G., Yakshina I.A. *Ekologicheskiy vestnik Severnogo Kavkaza*, 2017, 13(3): 36-37 (in Russ.).
 24. Bol'shiyanov D.Yu., Makarov A.S., Shnayder V., Shtof G. *Proiskhozhdenie i razvitie del'ty reki Leny* [Origin and development of the Lena River Delta]. St. Petersburg, 2013 (in Russ.).
 25. Safronova V.I., Kimeklis A.K., Chizhevskaya E.P., Belimov A.A., Andronov E.E., Pinaev A.G., Pukhaev A.R., Popov K.P., Tikhonovich I.A. Genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the relic species *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. *Antonie Leeuwenhoek*, 2014, 105(2): 389-399 (doi: 10.1007/s10482-013-0089-9).
 26. Andrews M., Andrews M.E. Specificity in Legume-Rhizobia symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(4): 705-744 (doi: 10.3390/ijms18040705).
 27. Zhang Y.J., Zheng W.T., Everall I., Young J.P.W., 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, 65(9): 2960-2967 (doi: 10.1099/ijs.0.000365).
 28. Jiao Y.S., Yan H., Ji Z.J., Liu Y.H., Sui X.H., Wang E.T., Guo B.L., Chen W.X., Chen W.F. *Rhizobium sophorae* sp. nov. and *Rhizobium sophoriradicis* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of the medicinal legume *Sophora flavescens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(2): 497-503 (doi: 10.1099/ijs.0.068916-0).
 29. Zhang J., Li S., Wang N., Yang T., Brunel B., Andrews M., Zong X., Wang E. *Rhizobium sophorae* is the dominant rhizobial symbiont of *Vicia faba* L. in North China. *Systematic and Applied Microbiology*, 2022, 45(1): 126-291 (doi: 10.1016/j.syapm.2021.126291).
 30. Saïdi S., Ramírez Bahena M.-H., Santillana N., Zúniga 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, 64(1): 242-247 (doi: 10.1099/ijs.0.052191-0).
 31. Taha K., Berraho El B., El Attar I., Dekkiche S., Aurag J., Béna G. *Rhizobium laguerreae* is the main nitrogen-fixing symbiont of cultivated lentil (*Lens culinaris*) in Morocco. *Systematic and Applied Microbiology*, 2018, 41(2): 113-121 (doi: 10.1016/j.syapm.2017.09.008).
 32. Zhang J., Shang Y., Peng S., Chen W., Wang E., de Lajudie P., Li B., Guo C., Liu C. *Rhizobium sophorae*, *Rhizobium laguerreae*, and two novel *Rhizobium* genospecies associated with *Vicia sativa* L. in Northwest China. *Plant and Soil*, 2019, 442(1): 113-126 (doi: 10.1007/s11104-019-04168-w).
 33. Flores-Félix J.D., Sánchez-Juanes F., García-Fraile P., Valverde A., Mateos P.F., González-Buitrago J.M., Velázquez E., Rivas R. *Phaseolus vulgaris* is nodulated by the symbiovar viciae of several genospecies of *Rhizobium laguerreae* complex in a Spanish region where *Lens culinaris* is the traditionally cultivated legume. *Systematic and Applied Microbiology*, 2019, 42(2): 240-247 (doi: 10.1016/j.syapm.2018.10.009).
 34. Flores-Félix J.D., Carro L., Cerda-Castillo E., Squartini A., Rivas R., Velázquez E. Analysis of the interaction between *Pisum sativum* L. and *Rhizobium laguerreae* strains nodulating this Legume in Northwest Spain. *Plants*, 2020, 9(12): 1755 (doi: 10.3390/plants9121755).
 35. Jiménez-Gómez A., Flores-Félix J.D., García-Fraile P., Mateos P.F., Menéndez E., Velázquez E., Rivas R. Probiotic activities of *Rhizobium laguerreae* on growth and quality of spinach. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 295 (doi: 10.1038/s41598-017-18632-z).
 36. Ayuso-Calles M., García-Estévez I., Jiménez-Gómez A., Flores-Félix J.D., Escribano-Bailón M.T., Rivas R. *Rhizobium laguerreae* improves productivity and phenolic compound content of lettuce (*Lactuca sativa* L.) under saline stress conditions. *Foods*, 2020, 9(9): 1166 (doi: 10.3390/foods9091166).
 37. Kabdullayeva T., Crosbie D.B., Marín M. *Mesorhizobium norvegicum* sp. nov., a rhizobium isolated from a *Lotus corniculatus* root nodule in Norway. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(1): 388-396 (doi: 10.1099/ijsem.0.003769).
 38. Jarvis B.D.W., Pankhurst C.E., Patel J.J. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1982, 32(3): 378-380 (doi: 10.1099/00207713-32-3-378).
 39. De Meyer S.E., Willems A. Multilocus sequence analysis of *Bosea* species and description of *Bosea lupini* sp. nov., *Bosea lathyri* sp. nov. and *Bosea robiniae* sp. nov., isolated from legumes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(10): 2505-2510 (doi: 10.1099/ijs.0.035477-0).

40. 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(4): 911-920 (doi: 10.1007/s10482-015-0383-9).
41. Sazanova A.L., Safronova V.I., Kuznetsova I.G., Karlov D.S., Belimov A.A., Andronov E.E., Chirak E.R., Popova J.P., Verkhovina A.V., Willems A., Tikhonovich I.A. *Bosea caraganae* sp. nov., a new species of slow-growing bacteria isolated from root nodules of the relict species *Caragana jubata* (Pall.) Poir. originating from Mongolia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69(9): 2687-2695 (doi: 10.1099/ijsem.0.003509).
42. Pulido-Suárez L., Flores-Félix J.D., Socas-Pérez N., Igual J.M., Velázquez E., Péix Á., León-Barrios M. Endophytic *Bosea spartocytisi* sp. nov. coexists with rhizobia in root nodules of *Spartocytisus supranubius* growing in soils of Teide National Park (Canary Islands). *Systematic and Applied Microbiology*, 2022, 45(6): 126374 (doi: 10.1016/j.syapm.2022.126374).