


**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И СИМБИОТИЧЕСКАЯ
ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛУБЕНЬКОВЫХ МИКРОСИМБИОНТОВ
ОСТРОЛОДОЧНИКА ТАЙМЫРСКОГО (*Oxytropis taimyrensis* (Jurtz.)
A. et D. Love), АСТРАГАЛА ХОЛОДНОГО (*Astragalus frigidus* (L.) A.Gray)
И АСТРАГАЛА ТУГАРИНОВА (*Astragalus tugarinovii* Basil.)
ИЗ АРКТИЧЕСКОЙ ЯКУТИИ***

И.Г. КУЗНЕЦОВА¹ [✉], Д.С. КАРЛОВ¹, П.В. ГУРО¹, А.Л. САЗАНОВА¹,
Н.Ю. ТИХОМИРОВА¹, Н.Н. ЛАЩИНСКИЙ², А.А. БЕЛИМОВ¹,
В.И. САФРОНОВА¹

Бобовые растения обладают значительным потенциалом для интродукции в арктических регионах России. Одно из ключевых свойств бобовых растений — способность формировать азотфиксирующий симбиоз с клубеньковыми бактериями (ризобиями). Однако изучению биоразнообразия и симбиотической эффективности арктических ризобий на территории России уделяется недостаточно внимания. В настоящей работе впервые описаны 13 штаммов порядка *Hyphomicrobiales* (ранее *Rhizobiales*), изолированных из клубеньков *Oxytropis taimyrensis*, *Astragalus frigidus* и *A. tugarinovii*, произрастающих в Арктической Якутии. Изучена способность девяти ризобияльных штаммов *Rhizobium* sp. 7/1-1, 19-1/1, 20-1/1 и 33-1/1, *R. giardinii* 20/1-1, *M. norvegicum* 20/1-4 и *Mesorhizobium* sp. 9-4/1, 25-2/1 и 32-2/1 нодулировать дикорастущие арктические бобовые *Oxytropis adamsiana* и *Astragalus frigidus* и кормовые бобовые *Trifolium repens* и *Medicago sativa* в условиях микровегетационного опыта. Целью работы было выделение и изучение генетического разнообразия штаммов порядка *Hyphomicrobiales*, изолированных из клубеньков дикорастущих бобовых *Oxytropis taimyrensis* (Jurtz.) A. et D. Love, *Astragalus frigidus* (L.) A.Gray и *Astragalus tugarinovii* Basil., собранных в Арктической зоне Якутии, а также выявление способности ризобияльных штаммов формировать азотфиксирующие клубеньки на корнях кормовых и дикорастущих бобовых растений *Trifolium repens* L., *Medicago sativa* L., *Oxytropis adamsiana* (Trautv.) Jurtzev и *Astragalus frigidus* (L.) A.Gray в условиях микровегетационного эксперимента по кросс-нодуляции. Корневые клубеньки дикорастущих популяций *O. taimyrensis*, *A. frigidus*, *A. tugarinovii* были собраны в 2021 году в окрестностях оз. Севастьян-Кюеле и на о. Тит-Ары в ходе российско-немецкой экспедиции в дельту реки Лены. Штаммы микроорганизмов выделяли по стандартной методике с использованием маннито-дрожжевой питательной среды YMA. Геномную ДНК из чистых культур выделяли с помощью наборов DNeasy Blood&Tissue kit («QIAGEN N.V.», Германия) и Monarch® («New England Biolabs», США). Первичная идентификация штаммов была проведена методом ПЦР с последующим секвенированием последовательностей фрагмента маркерного гена 16S рРНК (900-1400 п.н.) (*rrs*). Способность девяти арктических штаммов из рода *Rhizobium* и *Mesorhizobium* формировать азотфиксирующие клубеньки на корнях *Trifolium repens* L., *Medicago sativa* L., *O. adamsiana* и *A. frigidus* изучена в условиях стерильного микровегетационного опыта. Изучаемые штаммы были выделены в настоящей работе и ранее из клубеньков арктических бобовых *Lathyrus palustris* L., *Vicia cracca* L. и *Hedysarum arcticum* V. Fedtsch, произрастающих в дельте р. Лена. Растения культивировали в стерильных стеклянных сосудах объемом 50 мл, содержащих 3 г вермикулита и 6 мл среды Красильникова-Кореняко. Проростки были инокулированы суспензиями индивидуальных штаммов в количестве 10⁶ клеток/сосуд. В качестве положительного контроля использовали коммерческие штаммы *Rhizobium leguminosarum* RCAM1365 и *Sinorhizobium meliloti* RCAM1750 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 клубеньков и определяли сырую биомассу растений. Азотфиксирующую активность определяли ацетиленовым методом с помощью газового хроматографа GC-2014 («Shimadzu», Япония). Полученные изоляты были отнесены к родам *Rhizobium* (сем. *Rhizobiaceae*), *Mesorhizobium* (сем. *Phyllobacteriaceae*), *Bosea* (сем. *Boseaceae*) и *Tardiphaga* (сем. *Bradyrhizobiaceae*). Штаммы *Rhizobium* sp. 7/1-1, *Tardiphaga robiniae* 7/2-2 и 7/4-2 были выделены из *A. tugarinovii*, штаммы *Mesorhizobium* sp. 25-2/1, 25A/5-1, *Bosea* sp. 25A/1-3, *B. lathyri* 25A/2-1, *B. psychrotolerans* 25A/2-2 и 25A/4-1 — из *A. frigidus*, тогда как штаммы *Mesorhizobium* sp. 9-4/1, *T. robiniae* 9/1-5, 9/3-1 и 9/5-1 — из клубеньков *O. taimyrensis*. В условиях стерильного микровегетационного опыта штамм *R. giardinii* 20/1-1 не формировал клубеньки ни в одном из вариантов инокуляции, в то время как остальные восемь

* Исследование проводилось с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект РНФ № 20-76-10042-П).

штаммов были способны образовывать как неэффективные, так и азотфиксирующие клубеньки в зависимости от варианта инокуляции бобовых растений. В отношении местных арктических видов *O. adamsiana* и *A. frigidus* более активными оказались штаммы, выделенные из местных видов бобовых (*O. taimyrensis*, *A. frigidus*, *H. arcticum*), в то время как культурные растения *M. sativa* и *T. repens* оказались отзывчивее на инокуляцию штаммами, выделенными из заносных растений *L. palustris* и *V. cracca*. Способность *O. adamsiana* формировать эффективный симбиоз с *M. norvegicum* 20/1-4, *Mesorhizobium* sp. 9-4/1 и 25-2/1, выделенными соответственно из представителей бобовых родов *Hedysarum*, *Oxytropis* и *Astragalus*, свидетельствует о низкой хозяйской специфичности этого вида растений, что, возможно, позволяет ему использовать ресурсный потенциал широкого спектра симбиотических микроорганизмов, обитающих в почве различных регионов Арктики. Вид *O. adamsiana* широко распространен на Крайнем Севере и служит важным высокобелковым компонентом рациона питания местных животных, что дает основания отнести его к перспективным видам при создании многолетних пастбищных и сенокосных фитоценозов в экстремальных условиях Арктики.

Ключевые слова: Арктическая Якутия, бобовые растения, пастбищные и сенокосные агрофитоценозы, бобово-ризобияльный симбиоз, азотфиксирующие клубеньковые бактерии.

В последнее время развитию сельского хозяйства в Арктической зоне Российской Федерации уделяется все более пристальное внимание (1, 2). Устойчивое развитие животноводства и кормопроизводства на базе местных биологических ресурсов, адаптированных к сложным почвенно-климатическим условиям Арктики, позволит создать новые рабочие места и обеспечит местное население качественными и свежими продуктами питания, что будет способствовать повышению привлекательности северных территорий России (3). Так, И.С. Хантимер (4) показал возможность создания высокопродуктивных многолетних сенокосных лугов в Большеземельской тундре с целью обеспечения кормовой базой животноводческого хозяйства, расположенного в окрестностях г. Воркуты.

Ключевым высокобелковым компонентом природных сенокосов и пастбищ служат бобовые растения, которые широко распространены от Арктики до антарктических островов (5). Например, кормовое растение клевер ползучий (*Trifolium repens* L.) — одно из наиболее продуктивных пастбищных растений, значительно улучшающих плодородие и структуру почвы. Специально для выращивания в холодных регионах селекционерами выводятся холодостойкие сорта этого вида (6). Люцерна посевная *Medicago sativa* L. характеризуется высокой экологической пластичностью, устойчивостью к неблагоприятным условиям и относительно высокой зимостойкостью. Используется в травосмесях с многолетними злаковыми травами для создания культурных пастбищ и восстановления деградированных почв (7). Растения родов Остролодочник (*Oxytropis* DC.) и Астрагал (*Astragalus* L.) широко распространены в умеренных и арктических зонах Северного полушария, где служат кормом для диких и сельскохозяйственных животных и птиц (8, 9). Так, в тундровой зоне Восточной Сибири встречаются остролодочник таймырский (*Oxytropis taimyrensis* (Jurtz.) A. et D. Love) и астрагал Тугаринова (*Astragalus tugarinovii* Basil.), которые растут в основном на остепненных склонах, осыпях и в сухих редкостойных лиственничных лесах (10, 11). Вид *O. adamsiana* (Trautv.) Jurtzev распространен на Таймыре и в Северной Якутии, растет в тундре, редколесьях и в высокогорьях, где служит одним из важных компонентов пищевого рациона травоядных животных (8, 10-12). Вид *A. frigidus* (L.) A.Gray — широко распространенное за полярным кругом холодоустойчивое растение с высоким содержанием белка, рекомендованное к использованию в качестве кормовой и лекарственной культуры. На пастбищах хорошо поедается сельскохозяйственными животными и северными оленями (8). Показано, что включение бобовых растений в состав травосмесей пастбищных и сенокосных угодий способствует решению проблемы дефицита кормового белка и обеспечивает

экономное расходование ресурсов в кормопроизводстве и земледелии на Европейском Севере России (13-15).

Ключевым фактором для продуктивного возделывания бобовых культур служат их микросимбионты, которые могут участвовать в питании растений-хозяев, защите от патогенов и фитофагов, а также в регуляции развития и адаптации к условиям, вызывающим стресс. Один из основных лимитирующих факторов распространения и продуктивности растений на Крайнем Севере — недостаточная обеспеченность почвы легко доступными для растений соединениями азота (16).

Симбиотические клубеньковые бактерии (ризобии), фиксируя атмосферный азот, обеспечивают стабильное снабжение растений этим важнейшим биогенным элементом. Многие бобовые вступают в симбиоз только с определенными видами микроорганизмов. Основными микросимбионтами растений рода Клевер (*Trifolium*, триба *Trifolieae* Endl.) служат штаммы вида *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (17). Однако из корневых клубеньков различных видов *Trifolium* выделяют также и не типичные для этого рода бактерии, родственные видам *Rhizobium* и *Agrobacterium* (18, 19). Бобовые растения рода Люцерна (*Medicago* L.) входят в группу перекрестной инокуляции с представителями родов Донник (*Melilotus* (L.) Mill.) и Пажитник (*Trigonella* L.), формирующие азотфиксирующий симбиоз со штаммами *Ensifer meliloti* (ранее *Sinorhizobium meliloti*), однако в их клубеньках могут присутствовать и представители других родов, например *Agrobacterium* (20). Показано, что микросимбионты растений *Astragalus* могут принадлежать родам *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* и *Bosea* (21-24). Для растений *Oxytropis* типичными микросимбионтами считаются представители рода *Mesorhizobium*, но встречаются и *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Bosea* и *Tardiphaga* (21, 22, 25).

Бобово-ризобиальные отношения характеризуются сложной многокомпонентной структурой. Их экологическая и практическая роль обусловлена тем, что формирование взаимовыгодного растительно-микробного симбиоза оказывает влияние на качество урожая и свойства почвы в любой климатической зоне. Поэтому изучение биоразнообразия арктических ризобий имеет важное значение для развития сельского хозяйства в условиях Крайнего Севера.

В настоящей работе впервые описаны 13 штаммов порядка *Hyphomicrobiales* (ранее *Rhizobiales*), изолированных из клубеньков *Oxytropis taimyrensis*, *Astragalus frigidus* и *A. tugarinovii*, произрастающих в Арктической Якутии. Изучена способность девяти ризобиальных штаммов *Rhizobium* sp. 7/1-1, 19-1/1, 20-1/1 и 33-1/1, *R. giardinii* 20/1-1, *M. norvegicum* 20/1-4 и *Mesorhizobium* sp. 9-4/1, 25-2/1 и 32-2/1 нодулировать дикорастущие арктические бобовые *Oxytropis adamsiana* и *Astragalus frigidus* и кормовые бобовые *Trifolium repens* и *Medicago sativa* в условиях микровегетационного опыта.

Целью работы было выделение и изучение генетического разнообразия штаммов порядка *Hyphomicrobiales*, изолированных из клубеньков дикорастущих бобовых *Oxytropis taimyrensis* (Jurtz.) A. et D. Love, *Astragalus frigidus* (L.) A. Gray и *Astragalus tugarinovii* Basil., собранных в Арктической зоне Якутии, а также выявление способности ризобиальных штаммов формировать азотфиксирующие клубеньки на корнях кормовых и дикорастущих бобовых растений *Trifolium repens* L., *Medicago sativa* L., *Oxytropis adamsiana* (Trautv.) Jurtzev и *Astragalus frigidus* (L.) A. Gray в условиях микровегетационного эксперимента по кросс-нодуляции.

Методика. В ходе российско-немецкой экспедиции в дельту р. Лена в 2021 году в окрестностях оз. Севастьян-Кюеле (71°31'37.3" N 128°49'20.1" E)

и на о. Тит-Ары (71°57'32.7" N 127°05'53.3" E) были собраны корневые клубеньки и семена дикорастущих популяций бобовых растений *O. taimyrensis*, *A. frigidus* и *A. tugarinovii*.

Штаммы микроорганизмов выделяли по стандартной методике с использованием маннито-дрожжевой питательной среды YMA (Novikova and Safronova, 1992) после стерилизации клубеньков в течение 1 мин в 96 % этаноле. Чистые культуры изолятов (после последовательного двойного клонирования) были помещены на длительное хранение на станцию низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов при -80 °C («Liconic Instruments», Лихтенштейн). Информация о штаммах представлена в Интернет-базе данных Сетевой биоресурсной коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства (<https://arriam.ru/kollekciya-kul-tur1/>).

Геномную ДНК из чистых культур выделяли с помощью наборов DNeasy Blood&Tissue kit («QIAGEN N.V.», Германия) и Monarch® («New England Biolabs», США). Первичная идентификация штаммов была проведена методом ПЦР с последующим секвенированием последовательностей фрагмента маркерного гена 16S рРНК (900-1400 п.н.). Для амплификации использовали пару праймеров fD1 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' и rD1 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3' (26). Условия ПЦР были следующими: 3 мин 30 с при 95 °C (первичная денатурация); 1 мин 10 с при 94 °C (денатурация), 40 с при 56 °C (отжиг праймеров), 2 мин 10 с при 72 °C (элонгация) (35 циклов); 6 мин 10 с при 72 °C (финальная элонгация). Состав реакционной смеси для ПЦР: 38 мкл milli-Q H₂O («Евроген», Россия), 5 мкл буфера (ООО «Компания Хеликон», Россия), 5 мкл набора dNTP (ЗАО «Евроген», Россия), по 0,5 мкл праймеров (ЗАО «Евроген», Россия), 0,5 мкл Taq-полимеразы (ООО «Компания 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 (ЗАО «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 анализировали с помощью программы ChromasLite 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 были депонированы в GenBank под номерами PP512682-PP512693, PP578216.

Для постановки микровегетационного опыта (МВО) по кросс-нодуляции использовали семена дикорастущих арктических (*A. frigidus* и *O. adamsiana*) и кормовых (*T. repens* и *M. sativa*) бобовых растений, а также 9 бактериальных штаммов, полученных в настоящей работе и выделенных ранее из клубеньков арктических бобовых *Lathyrus palustris* L., *Vicia cracca* L. и *Hedysarum arcticum* В. Fedtsch. (27).

Семена растений скарифицировали и поверхностно стерилизовали в 98 % H₂SO₄ в течение 5 мин, тщательно промывали стерильной водопро-

водной водой и проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри при 25 °С в темноте в течение 3-5 сут (в зависимости от вида растения). Растения культивировали в стерильных стеклянных сосудах объемом 50 мл, содержащих 3 г вермикулита. В каждый сосуд добавляли по 6 мл среды Красильникова-Кореняко (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), а также смесь микроэлементов по Федорову объемом 1 мл следующего состава: H_3BO_3 — 0,05, $(NH_4)_2MoO_4$ — 0,05, KCl — 0,005, $NaBr$ — 0,005, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,003, $MnSO_4$ — 0,002 г/л.

Пробирки, содержащие по 2 проростка, инокулировали суспензиями индивидуальных штаммов в количестве 10^6 клеток на сосуд. Каждый вариант инокуляции был представлен четырьмя-пятью повторностями в зависимости от качества и уровня всхожести семян конкретного вида растения. Положительным контролем служили коммерческие штаммы *Rhizobium leguminosarum* RCAM1365 и *Sinorhizobium meliloti* RCAM1750 из Сетевой биоресурсной коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства (ФГБНУ ВНИИСХМ, г. Санкт-Петербург). Неинокулированные растения использовались в качестве отрицательного контроля.

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 мкмоль квантов $m^{-2} \cdot c^{-1}$, 20 °С, 2 ч), день (400 мкмоль квантов $m^{-2} \cdot c^{-1}$, 23 °С, 12 ч), вечер (200 мкмоль квантов $m^{-2} \cdot c^{-1}$, 20 °С, 2 ч). Освещение осуществлялось лампами L36W/77 FLUORA («OSRAM Licht AG», Германия). После окончания культивирования сырую биомассу растений взвешивали и подсчитывали образовавшиеся клубеньки. Азотфиксирующую активность клубеньков определяли ацетиленовым методом с помощью газового хроматографа GC-2014 («Shimadzu», Япония).

Данные МВО обрабатывали стандартным методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в статистической среде R (v. 4.2.3; R Core Team, 2023). Определяли средние значения (M) и стандартные отклонения ($\pm SD$) для каждого из измеряемых симбиотических параметров в каждом варианте инокуляции. При статистически значимых результатах ANOVA ($p < 0,05$) проводился тест Дункана для множественного сравнения средних с помощью пакета agricolae.

Результаты. Арктическое озеро Севастьян-Кюеле (рис. 1) расположено в подзоне типичных тундр в 10 км южнее пос. Тикси среди невысоких гор Приморского кряжа. Территория относится к области сплошного распространения многолетнемерзлых грунтов. Почвы щебнистые маломощные криоземы. Растительность окрестностей озера представлена различными вариантами тундр от дриадовых и типчаковых на дренированных позициях до болотистых на понижениях вблизи озера с преобладанием кустарничково-зеленомошных тундр. Большие площади заняты подвижными мелкощебнистыми осыпями с оригинальными слабо сомкнутыми растительными сообществами. Климат суровый. Продолжительность лета всего 2 мес, со средней температурой июля 11 °С (28).

Остров Тит-Ары (см. рис. 1) расположен в южной части дельты Лены и сформирован преимущественно песчаными аллювиальными отложениями. Это один из наиболее крупных островов Нижней Лены и самая северная область распространения лесов на территории Восточной Сибири. Растительность острова представлена редкостойными лиственничными лесами в сочетании с сообществами кустарниковых тундр, ольшатниками и гигрофильными злаковниками. Территория входит в состав государственного природного заповедника «Усть-Ленский» и относится к ресурсному



Рис. 1. Места сбора растений *Oxytropis taimyrensis* (Jurtz.) A. et D. Love, *Astragalus frigidus* (L.) A. Gray и *Astragalus tugarinovii* Basil. на о. Тит-Ары (дельта реки Лены) и в районе оз. Севастьян-Кюеле (окрестности Тикси).

1. Изоляты, выделенные из клубеньков *Astragalus tugarinovii* Basil., *Oxytropis taimyrensis* (Jurtz.) A. et D. Love и *Astragalus frigidus* (L.) A. Gray, собранных в районе оз. Севастьян-Кюеле и на о. Тит-Ары (2021 год)

Место сбора	№ штамма	Ближайший типовой штамм	Сходство гена <i>rrs</i> , %	Результат идентификации
<i>Astragalus tugarinovii</i>				
оз. Севастьян-Кюеле	7/1-1	<i>R. brockwellii</i> CC275e <i>R. sophorae</i> LMG 27901 <i>R. anhuiense</i> CCBAU 23252 <i>R. indicum</i> JKLM 12A2	100	<i>Rhizobium</i> sp.
	7/2-2	<i>T. robiniae</i> R-45977	99,93	<i>Tardiphaga robiniae</i>
	7/4-2	<i>T. robiniae</i> R-45977	99,93	<i>Tardiphaga robiniae</i>
<i>Oxytropis taimyrensis</i>				
оз. Севастьян-Кюеле	9/1-5	<i>T. robiniae</i> R-45977	99,93	<i>Tardiphaga robiniae</i>
	9/3-1	<i>T. robiniae</i> R-45977	99,93	<i>Tardiphaga robiniae</i>
	9-4/1	<i>M. jarvisii</i> ATCC 33669 <i>M. carmichaelinearum</i> MonP1N1	99,93 99,92	<i>Mesorhizobium</i> sp.
	9/5-1	<i>T. robiniae</i> R-45977	99,93	<i>Tardiphaga robiniae</i>
<i>Astragalus frigidus</i>				
о. Тит-Ары	25A/1-3	<i>B. lathyri</i> R-46060	99,13	<i>Bosea</i> sp.
	25-2/1	<i>M. shangrilense</i> CCBAU 65327 <i>M. qingshengii</i> CCBAU 33460	99,85	<i>Mesorhizobium</i> sp.
		25A/2-1	<i>B. lathyri</i> R-46060	100
	25A/2-2	<i>B. psychrotolerans</i> 1131 <i>B. vaviloviae</i> Vaf18	99,93 99,86	<i>Bosea</i> sp.
		25A/4-1	<i>B. psychrotolerans</i> 1131 <i>B. vaviloviae</i> Vaf18	100 99,78
	25A/5-1	<i>M. shangrilense</i> CCBAU 65327 <i>M. qingshengii</i> CCBAU 33460	99,92	<i>Mesorhizobium</i> sp.

Из клубеньков бобовых растений *O. taimyrensis*, *A. tugarinovii* и *A. frigidus*, собранных в районе оз. Севастьян-Кюеле и на о. Тит-Ары, было выделено соответственно 4, 3 и 6 изолятов. Штаммы 7/1-1, 9-4/1, 25-2/1 и 25A/5-1 формировали колонии на 3-4-е сут, остальные — на 5-6-е сут. На основании анализа гена *rrs* изоляты были отнесены к родам *Rhizobium* (сем.

Rhizobiaceae), *Mesorhizobium* (сем. *Phyllobacteriaceae*), *Bosea* (сем. *Boseaceae*) и *Tardiphaga* (сем. *Bradyrhizobiaceae*) порядка *Hyphomicrobiales* (табл. 1).

Штамм 7/1-1 из клубенька *A. tugarinovii* показал 100 % сходство по *rrs* гену сразу с девятью типовыми штаммами: *R. brockwellii* CC275e, *R. sophorae* LMG 27901, *R. indigoferae* CIP 108029, *R. anhuiense* CCBAU 23252, *R. indicum* JKLM 12A2, *R. ruizarguesonis* UPM1133, *R. laguerreae* FB206, *R. leguminosarum* LMG 14904, *R. leguminosarum* bv. *viciae* USDA 2370. Уточнение видовой принадлежности штамма 7/1-1 будет определено по результатам секвенирования и анализа его полного генома.

Штамм 9-4/1 из клубенька *O. taimyrensis* показал более 99,9 % сходства по *rrs* гену с типовыми штаммами *M. jarvisii* ATCC 33669 и *M. carmichaelinearum* MonPIN1. Штамм *M. jarvisii* ATCC 33669 впервые был выделен из клубеньков лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L.) (31), тогда как штамм *M. carmichaelinearum* MonPIN1 выделен из клубеньков монтигены новозеландской (*Montigena novae-zelandiae* (Hook.f.) Heenan), произрастающей на Южном острове в Новой Зеландии (32).

Штаммы 25-2/1 и 25A/5-1 из клубеньков *A. frigidus* демонстрировали наибольшее сходство по гену *rrs* (более 99,85 %) с типовыми штаммами *M. shangrilense* CCBAU 65327 и *M. qingshengii* CCBAU 33460, выделенными соответственно из клубенька караганы двуцветной (*Caragana bicolor* Kom.) и астрагала китайского (*A. sinicus* L.) (33, 34).

Штаммы 25A/1-3, 25A/2-1, 25A/2-2 и 25A/4-1 из клубеньков *A. frigidus* на основании анализа *rrs* гена были отнесены к роду *Bosea*. Штаммы 25A/1-3 и 25A/2-1 показали соответственно 99,13 и 100 % сходства с ближайшим типовым штаммом *B. lathyri* R-46060, выделенным из клубенька чины широколистной (*L. latifolius* L.), произрастающей в Бельгии (35). Штаммы 25A/2-2 и 25A/4-1 были родственны на уровне 99,86-100 % сходства с типовыми штаммами *B. psychrotolerans* 1131 и *B. vaviloviae* Vaf18. Штамм *B. psychrotolerans* 1131 был выделен из воды оз. Мичиган (США) и описан как психротрофный представитель класса *Proteobacteria*, тогда как штамм *B. vaviloviae* Vaf18 был выделен из клубенька вавиловии прекрасной (*Vavilovia formosa* (Steven) Fed), произрастающей на Северном Кавказе (Российская Федерация) (36, 37). Следует отметить, что представители рода *Bosea* присутствуют в клубеньках различных видов бобовых растений: *Lupinus*, *Lathyrus*, *Robinia*, *Vavilovia*, *Caragana*, *Spartocytisus*, *Vicia*, *Astragalus*, *Oxytropis*, *Hedysarum* (24, 26, 35-40). Однако способность штаммов *Bosea* к самостоятельному формированию клубеньков до сих пор не установлена.

Изоляты 7/2-2, 7/4-2 и 9/1-5, 9/3-1, 9/5-1, выделенные соответственно, из *A. tugarinovii* и *O. taimyrensis*, показали 99,93 % сходства по гену *rrs* с ближайшим типовым штаммом *T. robiniae* R-45977. Представители вида *T. robiniae* встречаются в клубеньках узколокальных эндемиков рода Остролодочник, реликтового растения вавиловии прекрасной (*Vavilovia formosa* (Steven) Fed.), робинии ложноакациевой (*Robinia pseudoacacia* L.) (25, 41), а также в клубеньках других видов бобовых (24, 26, 40). Показано, что геномы некоторых штаммов *T. robiniae* могут содержать отдельные симбиотические гены (*nod*, *nif* и *fix*) (25).

Способность девяти ризобияльных штаммов *Rhizobium* sp. 7/1-1, 19-1/1, 20-1/1 и 33-1/1, *R. giardinii* 20/1-1, *M. norvegicum* 20/1-4 и *Mesorhizobium* sp. 9-4/1, 25-2/1 и 32-2/1 нодулировать дикорастущие арктические бобовые *O. adamsiana* и *A. frigidus* (табл. 2) и сельскохозяйственные кормовые бобовые *T. repens* и *M. sativa* (табл. 3) изучали в условиях стерильного микрорегитационного опыта.

2. Эффект инокуляции бобовых растений *Oxytropis adamsiana* (Trautv.) Jurtzev и *Astragalus frigidus* (L.) A. Gray арктическими изолятами в условиях стерильного микровегетационного опыта ($M \pm SD$)

Вариант инокуляции	Число клубеньков на растении	Сырая биомасса, мг/растение			Ацетилен-редуктазная активность, мкмоль $C_2H_4 \cdot \text{растение}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$
		побег	корень	общая масса	
<i>Oxytropis adamsiana</i> (n = 4)					
Без инокуляции	0	33,2±8,6	17,7±4,4 ^{bcd}	50,8±10,6	0
<i>Rhizobium</i> sp. 19-1/1*	0	42,4±11,4	26,2±10,9 ^{ab}	68,6±13,5	н/о
<i>Rhizobium</i> sp. 33-1/1*	0	45,9±7,7	27,9±5,9 ^a	73,8±11,3	н/о
<i>Rhizobium</i> sp. 20-1/1*	0	40,2±12,6	22,0±7,4 ^{abcd}	62,2±19,4	н/о
<i>Mesorhizobium</i> sp. 32-2/1*	0	28,5±7,8	14,8±2,0 ^d	43,3±7,9	н/о
<i>R. giardinii</i> 20/1-1**	0	40,6±6,8	15,5±4,5 ^{cd}	56,1±10,4	н/о
<i>Mesorhizobium</i> sp. 9-4/1***	2,0±0,0 ^b	43,7±19,3	17,9±5,3 ^{abcd}	62,4±21,4	0,6±0,12 ^a
<i>Mesorhizobium</i> sp. 25-2/1***	4,8±0,8 ^a	44,7±5,2	24,5±6,8 ^{abc}	69,2±6,3	0,6±0,24 ^a
<i>Rhizobium</i> sp. 7/1-1***	0	44,7±13,4	15,2±4,0 ^{cd}	59,8±12,3	н/о
<i>M. norvegicum</i> 20/1-4**	4,0±1,4 ^a	41,0±4,0	16,7±3,9 ^{bcd}	57,7±8,2	0,6±0,18 ^a
<i>Astragalus frigidus</i> (n = 5)					
Без инокуляции	0	51,2±2,2 ^{ab}	14,2±4,9 ^c	65,4±5,8 ^{bc}	0
<i>Rhizobium</i> sp. 19-1/1*	0	41,0±7,4 ^{bc}	21,8±4,9 ^{bc}	62,8±8,0 ^{bc}	н/о
<i>Rhizobium</i> sp. 33-1/1*	0	26,0±8,9 ^e	36,0±15,2 ^a	62,0±21,7 ^{bc}	н/о
<i>Rhizobium</i> sp. 20-1/1*	0	54,6±7,1 ^a	33,2±9,3 ^{ab}	87,8±4,4 ^a	н/о
<i>Mesorhizobium</i> sp. 32-2/1*	0	42,0±8,4 ^{bc}	28,0±8,4 ^{ab}	70,0±15,8 ^b	н/о
<i>R. giardinii</i> 20/1-1**	0	24,0±5,5 ^e	22,2±7,4 ^{bc}	46,2±10,6 ^c	н/о
<i>Mesorhizobium</i> sp. 9-4/1***	1,8±0,4 ^a	30,0±10,0 ^{de}	23,0±6,7 ^{bc}	53,0±13,0 ^{bc}	0,1±0,02 ^b
<i>Mesorhizobium</i> sp. 25-2/1***	1,8±0,4 ^a	30,0±7,1 ^{de}	22,0±4,5 ^{bc}	52,0±4,5 ^{bc}	0,2±0,02 ^a
<i>Rhizobium</i> sp. 7/1-1***	0	20,0±7,1 ^e	26,0±5,5 ^{abc}	46,0±5,5 ^c	н/о
<i>M. norvegicum</i> 20/1-4**	0,8±0,4 ^b	38,0±10,4 ^{cd}	23,0±9,7 ^{bc}	61,0±18,8 ^{bc}	0

Примечание. н/о — не определялось; * — штаммы, ранее изученные на способность формировать азотфиксирующие клубеньки на кормовых бобовых растениях *V. cracca*, *V. sativa*, *L. sativus* и *L. pratensis* (22); ** — штаммы, ранее выделенные из клубеньков арктического дикорастущего бобового *H. arcticum* (42); *** — штаммы, полученные в настоящей работе.

a, b, c, d, e Разными латинскими буквами отмечены варианты, различия между которыми статистически значимы (критерий Дункана, $p < 0,05$). В вариантах без буквенного ранжирования статистически значимых групповых различий ($p > 0,05$) выявлено не было и тест Дункана не проводился.

3. Эффект инокуляции бобовых растений *Trifolium repens* L. и *Medicago sativa* L. арктическими изолятами и коммерческими штаммами *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1365 и *Sinorhizobium meliloti* RCAM1750 в условиях стерильного микровегетационного опыта ($M \pm SD$)

Вариант инокуляции	Число клубеньков на растении	Сырая биомасса, мг/растение			Ацетилен-редуктазная активность, мкмоль $C_2H_4 \cdot \text{растение}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$
		побег	корень	общая масса	
<i>Trifolium repens</i> (n = 5)					
Без инокуляции	0	47,6±4,3 ^{ab}	46,0±19,5 ^{bc}	93,6±23,1	0
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> RCAM1365	6,6±1,8 ^b	58,0±8,4 ^a	29,0±8,9 ^c	87,0±16,4	0,9±0,5
<i>Rhizobium</i> sp. 19-1/1*	5,4±1,5 ^b	53,0±14,8 ^a	60,0±12,2 ^{abc}	113,0±24,4	0
<i>Rhizobium</i> sp. 33-1/1*	5,4±1,1 ^b	43,6±8,6 ^{ab}	50,0±18,7 ^{ab}	93,6±24,0	0
<i>Rhizobium</i> sp. 20-1/1*	2,2±0,8 ^c	44,0±7,1 ^{ab}	45,0±11,2 ^{bc}	89,0±13,4	0
<i>Mesorhizobium</i> sp. 32-2/1*	3,0±1,0 ^c	50,0±15,2 ^a	46,0±18,2 ^{bc}	96,0±20,7	0
<i>R. giardinii</i> 20/1-1	0	54,0±20,7 ^a	52,0±25,9 ^{abc}	106,0±42,2	н/о
<i>Mesorhizobium</i> sp. 9-4/1	0	44,0±5,5 ^{ab}	64,0±23,0 ^{ab}	108,0±21,8	н/о
<i>Mesorhizobium</i> sp. 25-2/1	0	32,0±13,0 ^b	70,0±12,2 ^{ab}	102,0±21,7	н/о
<i>Rhizobium</i> sp. 7/1-1	0	44,0±8,9 ^{ab}	76,0±18,2 ^a	120,0±22,4	н/о
<i>M. norvegicum</i> 20/1-4**	0	44,0±11,4 ^{ab}	58,0±21,7 ^{ab}	102,0±26,8	н/о
<i>Medicago sativa</i> (n = 5)					
Без инокуляции	0	42,0±8,4 ^{ab}	57,6±18,4	99,6±16,5	0
<i>S. meliloti</i> RCAM1750	9,0±3,4 ^a	48,8±19,6 ^a	40,4±8,0	89,2±25,2	0,9±0,4
<i>Rhizobium</i> sp. 19-1/1*	2,0±0,7 ^c	38,0±11,0 ^{abc}	66,4±20,3	104,4±26,7	0
<i>Rhizobium</i> sp. 33-1/1*	2,4±0,5 ^c	36,0±11,9 ^{abc}	48,6±17,5	84,6±22,6	0
<i>Rhizobium</i> sp. 20-1/1*	2,4±0,4 ^c	26,0±15,2 ^{bc}	46,4±20,1	72,4±33,6	0
<i>Mesorhizobium</i> sp. 32-2/1*	0	26,0±5,5 ^{bc}	44,0±13,4	70,0±18,7	н/о
<i>R. giardinii</i> 20/1-1**	0	24,0±4,2 ^c	31,8±16,2	55,8±14,8	н/о
<i>Mesorhizobium</i> sp. 9-4/1***	0	33,0±14,8 ^{abc}	46,0±17,1	79,0±26,6	н/о
<i>Mesorhizobium</i> sp. 25-2/1***	5,2±1,3 ^b	38,0±11,0 ^{abc}	50,0±15,8	88,0±25,9	0
<i>Rhizobium</i> sp. 7/1-1***	3,2±0,4 ^c	36,0±11,4 ^{abc}	52,0±19,2	88,0±17,9	0
<i>M. norvegicum</i> 20/1-4**	0	28,0±4,5 ^{bc}	52,0±19,2	80,0±17,3	н/о

Примечание. н/о — не определялось. * — штаммы, ранее изученные на способность формировать азотфиксирующие клубеньки на кормовых бобовых растениях *V. cracca*, *V. sativa*, *L. sativus* и *L. pratensis* (22); ** — штаммы, ранее выделенные из клубеньков арктического дикорастущего бобового *H. arcticum* (42); *** — штаммы, полученные в настоящей работе.

a, b, c, d, e Разными латинскими буквами отмечены варианты, различия между которыми статистически значимы (критерий Дункана, $p < 0,05$). В вариантах без буквенного ранжирования статистически значимых групповых различий ($p > 0,05$) выявлено не было и тест Дункана не проводился.

Ранее штаммы *Rhizobium* sp. 19-1/1 и 33-1/1, *Rhizobium* sp. 20-1/1 и *Mesorhizobium* sp. 32-2/1, *R. giardinii* 20/1-1 и *M. norvegicum* 20/1-4 были выделены соответственно из клубеньков арктических дикорастущих бобовых чины болотной (*L. palustris*), вики мышиной (*V. cracca*) и копеечника арктического (*H. arcticum*), собранных в дельте р. Лены и окрестностях п. Тикси в Арктической зоне Якутии (27, 42). У штаммов *Mesorhizobium* sp. 32-2/1 и *Rhizobium* sp. 19-1/1, 20-1/1 и 33-1/1 обнаружена способность формировать преимущественно неазотфиксирующие клубеньки на корнях сельскохозяйственных бобовых *V. cracca*, *V. sativa*, *L. sativus* и *L. pratensis* (27). Для двух штаммов *R. giardinii* 20/1-1 и *M. norvegicum* 20/1-4 была установлена видовая принадлежность на основе молекулярно-филогенетических методов (42).

Мы показали, что на растениях *O. adamsiana* эффективные клубеньки (рис. 2, в, г) образовывались в трех вариантах инокуляции штаммами *Mesorhizobium* sp. 9-4/1, 25-2/1 и *M. norvegicum* 20/1-4. Несмотря на одинаковую азотфиксирующую активность, число клубеньков в вариантах варьировалось. Средние значения массы побегов и общей сырой массы растений в большинстве вариантов инокуляции были выше по сравнению с вариантом без инокуляции, однако статистически значимых групповых различий между вариантами не наблюдалось (см. табл. 2). Следует отметить, что штаммы *Mesorhizobium* sp. 9-4/1, 25-2/1 и *M. norvegicum* 20/1-4 были выделены соответственно из клубеньков *O. taimyrensis*, *A. frigidus* и *H. arcticum*, что указывает на широкую специфичность растений *O. adamsiana* и, предположительно, позволяет этому виду лучше адаптироваться к различным почвенно-климатическим условиям Арктики. Интересно, что наиболее высокие симбиотические параметры (общая сырая биомасса, масса побегов и корней) были отмечены в варианте инокуляции штаммом *Rhizobium* sp. 33-1/1, хотя клубеньков на *O. adamsiana* он не образовывал. Для объяснения этого эффекта необходимо изучить способность штамма *Rhizobium* sp. 33-1/1 к продукции фитогормонов ауксинов и цитокининов, влияющих на восприимчивость корневой системы растений.

На *A. frigidus* клубеньки (см. рис. 2, а, б) образовывались в трех вариантах инокуляции штаммами *M. norvegicum* 20/1-4, *Mesorhizobium* sp. 25-2/1 и 9-4/1, тогда как эффективный симбиоз был отмечен только в двух последних случаях (см. табл. 2). В большинстве вариантов средние значения массы побега были достоверно ($p < 0,05$) ниже по сравнению с контролем без инокуляции. Однако в вариантах с *Rhizobium* sp. 20-1/1, 33-1/1 и *Mesorhizobium* sp. 32-2/1 средние значения массы корня оказались выше ($p < 0,05$) по сравнению с неинокулированным контролем. В случае со штаммом *Rhizobium* sp. 20-1/1 и средние значения общей массы растения также были достоверно ($p < 0,05$) выше по сравнению с другими вариантами инокуляции.

На *T. repens* неэффективные клубеньки (рис. 3, в, г) образовывались в четырех вариантах инокуляции штаммами *Mesorhizobium* sp. 32-2/1, *Rhizobium* sp. 19-1/1, 33-1/1 и 20-1/1 (см. табл. 3). В вариантах инокуляции *Mesorhizobium* sp. 32-2/1 и *Rhizobium* sp. 20-1/1 среднее количество клубеньков было достоверно ($p < 0,05$) меньше по сравнению с коммерческим штаммом *R. leguminosarum* RCAM1365. Отметим, что в варианте инокуляции *Rhizobium* sp. 7/1-1 среднее значение массы корня было достоверно выше, тогда как среднее значение общей биомассы растения оказалось недостоверно выше в сравнении с положительным контролем. В варианте со штаммом *Mesorhizobium* sp. 25-2/1 также показано, что среднее значение массы побега выше по сравнению с вариантом инокуляции с *R. leguminosarum* RCAM1365 ($p < 0,05$).



Рис. 2. Клубеньки на корнях *Astragalus frigidus* (L.) A.Gray (а, б) и *Oxytropis adamsiana* (Trautv.) Jurtzev (в, г), полученные при инокуляции растений штаммами *Mesorhizobium* sp. 9-4/1 (б, г) и 25-2/1 (а, в) (микровегетационный опыт).

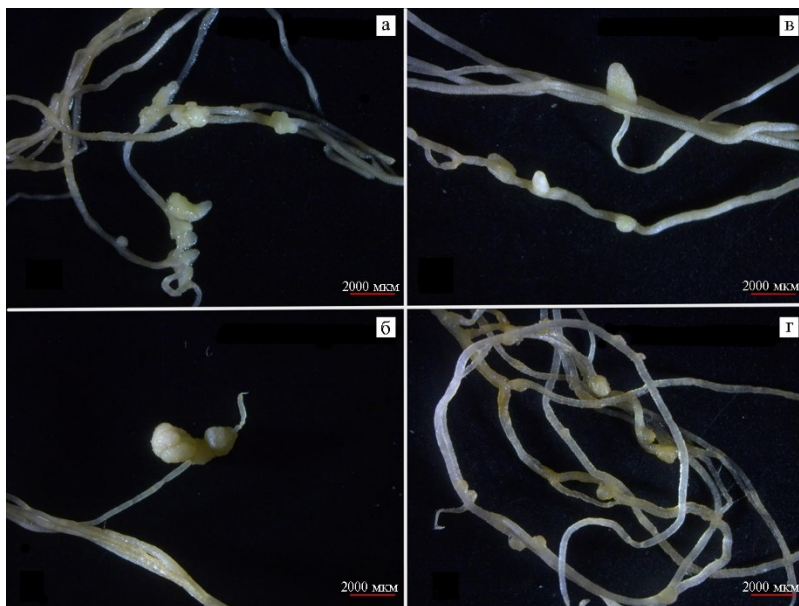


Рис. 3. Клубеньки и клубенькоподобные формирования на корнях *Medicago sativa* L. (а, б) и *Trifolium repens* L. (в, г), полученные при инокуляции растений штаммами *Rhizobium* sp. 20-1/1 (а), 19-1/1 (в), и 33-1/1 (б, г) (микровегетационный опыт).

На *M. sativa* неэффективные клубеньки формировались в пяти вариантах инокуляции штаммами *Mesorhizobium* sp. 25-2/1, *Rhizobium* sp. 19-1/1, 33-1/1, 20-1/1 и 7/1-1. Помимо типичных клубеньков, в некоторых вариантах инокуляции на корнях *M. sativa* формировались клубенькоподобные образования (см. рис. 3, а, б). В варианте инокуляции штаммом *Rhizobium* sp. 19-1/1 среднее значение массы корня и общей биомассы было выше в сравнении с остальными вариантами и коммерческим штаммом *S. meliloti* RCAM1750, однако статистически значимых различий между ними не наблюдалось. При инокуляции штаммом *R. giardinii* 20/1-1 отмечали пони-

женные значения всех симбиотических параметров в сравнении с *S. meliloti* RCAM1750, однако достоверные ($p < 0,05$) отличия были зафиксированы только для средних значений массы побега.

Ранее в работе А.Е. Крисс и соавт. из клубеньков дикорастущих бобовых *Oxytropis nigrescens* (Pall.) Fisch., *O. maydelliana* Trautv., *Astragalus alpinus* L., *A. umbellatus* Bunge и *Hedysarum obscurum* L., произрастающих в тундре Чукотского полуострова, о-ва Колючин и Врангеля, было изолировано 8 бактериальных штаммов, не способных в вегетационных опытах образовывать клубеньки на корнях кормовых бобовых растений клевера, донника, люцерны, гороха и вики. Однако наблюдалась способность некоторых штаммов образовывать клубеньки на дикорастущих бобовых *H. alpinum* L., *H. sibiricum* Poig. и *A. trautvetteri* Bunge., при этом азотфиксирующая активность клубеньков не изучалась (43). В корневых клубеньках дикорастущих популяций бобовых растений *Lathyrus pratensis* L., *Vicia cracca* L., *Trifolium repens* L. и *Astragalus schelichowii* Turcz., собранных в окрестностях города Норильска, были обнаружены представители родов *Rhizobium* (сем. *Rhizobiaceae*), *Bosea* (сем. *Boseaceae*) и *Tardiphaga* (сем. *Bradyrhizobiaceae*), однако изучение симбиотических параметров (общая сырая биомасса растений, уровень азотфиксирующей активности и т.д.) бобово-ризобиального симбиоза не проводилось (40).

В работах D. Prévost с соавт. (44, 45) была продемонстрирована способность штаммов, выделенных из клубеньков арктических видов бобовых *Astragalus* и *Oxytropis*, произрастающих в Канаде, эффективно нодулировать кормовое бобовое растение эспарцет виколистный (*Onobrychis viciifolia*), произрастающий в умеренных широтах. Показано, что арктические ризобии были более эффективны, чем ризобии (коммерческие штаммы) умеренных широт, в улучшении роста и продуктивности эспарцета в условиях низкотемпературных лабораторных и полевых опытов. По мнению некоторых авторов (46, 47), АТФаза, транспортирующая β -глюкан, который участвует в прикреплении бактериальных клеток к корням растений для инициирования симбиотического взаимодействия, может играть решающую роль в инициировании симбиоза при низких температурах. Повышенный уровень синтеза белков холодового шока у арктических ризобий также может быть одной из причин их адаптации к экстремальным условиям Севера (47). Изучение эффективности симбиоза бобовых с арктическими ризобиями позволяет отбирать наиболее эффективные азотфиксирующие штаммы, адаптированные к местным экстремальным почвенно-климатическим условиям, а также использовать их в качестве основы для селекции и направленного генетического конструирования штаммов, перспективных для внедрения в сельскохозяйственную практику на Крайнем Севере (27).

Таким образом, из клубеньков арктических дикорастущих бобовых растений *Oxytropis taimyrensis*, *Astragalus frigidus* и *Astragalus tugarinovii* было выделено 13 изолятов, относящихся к родам *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bosea* и *Tardiphaga* из порядка *Hyphomicrobiales* (α -Proteobacteria). Штаммы *Rhizobium* sp. 7/1-1, *Tardiphaga robiniae* 7/2-2 и 7/4-2 были выделены из *A. tugarinovii*, штаммы *Mesorhizobium* sp. 25-2/1, 25A/5-1, *Bosea* sp. 25A/1-3, *B. lathyri* 25A/2-1, *B. psychrotolerans* 25A/2-2 и 25A/4-1 — из *A. frigidus*, тогда как штаммы *Mesorhizobium* sp. 9-4/1, *T. robiniae* 9/1-5, 9/3-1 и 9/5-1 — из клубеньков *O. taimyrensis*. В результате постановки микровегетационного опыта с участием дикорастущих арктических (*Oxytropis adamsiana* и *Astragalus frigidus*) и сельскохозяйственных кормовых (*Trifolium repens* и *Medicago sativa*) бобовых растений штамм *R. giardinii* 20/1-1 был единственным, не сформировавшим клубеньки ни в одном из вариантов инокуляции. В целом в

отношении местных арктических видов *O. adamsiana* и *A. frigidus* были более активны штаммы, выделенные из местных же видов бобовых (*O. taimyrensis*, *A. frigidus*, *H. arcticum*), в то время как культурные растения *M. sativa* и *T. repens* оказались более отзывчивы на инокуляцию штаммами *Rhizobium* sp. 19-1/1 и 33-1/1, *Rhizobium* sp. 20-1/1 и *Mesorhizobium* sp. 32-2/1, выделенными соответственно из заносных бореальных растений *L. palustris* и *V. cracca*. Наблюдаемый симбиоз во всех случаях инокуляции характеризовался относительно низкой азотфиксирующей активностью и не приводил к статистически значимому увеличению массы побегов и общей массы растений, хотя прибавка в ряде случаев достигала 34–36 % относительно неинокулированного контроля. Однако необходимо отметить существенный позитивный эффект в отношении массы корней, выявленный у ряда штаммов (*M. norvegicum* 20/1-4, *Mesorhizobium* sp. 9-4/1, 25-2/1 и 32-2/1, *Rhizobium* sp. 7/1-1 и 20-1/1, 33-1/1), которые не образуют симбиоз в отдельных вариантах или формируют неактивные клубеньки. Для понимания механизма этого эффекта необходимо секвенирование полногеномных последовательностей штаммов, а также поиск и функциональное изучение соответствующих рост-стимулирующих генов синтеза ауксинов, гиббереллинов и цитокининов. Следует отметить, что способность распространенного на Таймыре и в Якутии вида *O. adamsiana* формировать эффективный симбиоз с тремя арктическими ризобияльными штаммами позволяет рассматривать его в качестве перспективного компонента при создании высокопродуктивных бобово-злаковых агрофитоценозов в различных почвенно-климатических условиях Арктики.

Выражаем благодарность руководству и координаторам экспедиции «Лена 2021» за организацию и проведение экспедиции в район дельты реки Лены. Искренне благодарим Сергея Александровича Правкина (ААНИИ) за помощь в сборе и транспортировке семян бобовых культур. Выражаем благодарность коллективу научно-исследовательской станции «Остров Самойловской» и лично Федору Виссанионовичу Селяхову за предоставленный транспорт.

¹ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: ig.kuznetsova@arriam.ru ✉, ds.karlov@arriam.ru,
guro.pv@arriam.ru, anna_sazanova@mail.ru, n_tikhomirova@rambler.ru,
belimov@arriam.ru, vi.safronova@arriam.ru;

Поступила в редакцию
18 апреля 2024 года

²ФГБУН Центральный сибирский ботанический сад
СО РАН,
630090 Россия, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101,
e-mail: nick_lash@mail.ru

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2024, V. 59, № 5, pp. 927–942

THE GENETIC DIVERSITY AND SYMBIOTIC EFFICIENCY
OF THE NODULE MICROSymbionTS ISOLATED FROM
Oxytropis taimyrensis (Jurtz.) A. et D. Love, *Astragalus frigidus* (L.) A. Gray
AND *Astragalus tugarinovii* Basil. FROM ARCTIC YAKUTIA

I.G. Kuznetsova¹ ✉, D.S. Karlov¹, P.V. Guro¹, A.L. Sazanova¹, N.Yu. Tikhomirova¹,
N.N. Lashchinskiy², A.A. Belimov¹, V.I. Safronova¹

¹All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail ig.kuznetsova@arriam.ru (✉ corresponding author), ds.karlov@arriam.ru, guro.pv@arriam.ru, anna_sazanova@mail.ru, n_tikhomirova@rambler.ru, belimov@arriam.ru, vi.safronova@arriam.ru;

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

ORCID:

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

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

Acknowledgements:

We would like to thank the management and coordinators of the Lena 2021 expedition for organizing and conducting the expedition to the Lena River Delta area. We would like to express our sincere gratitude to Sergei A. Pravkin (AARI) for his assistance in collecting and transporting legume seeds. We would like to thank the staff of the Samoylovskoy Island research station and personally Fyodor V. Selyakhov for the provided transport.

The work was carried out using the equipment of the Genome Technologies, Proteomics and Cell Biology Collective Use Center of the All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology.

Supported financially by the Russian Science Foundation (RSF project No. 20-76-10042- II)

Final revision received April 18, 2024

doi: 10.15389/agrobiology.2024.5.927eng

Accepted May 12, 2024

Abstract

Legumes have significant potential for introduction into the Arctic regions of Russia. One of the key characteristics of legumes is the ability to form nitrogen-fixing symbioses with nodule bacteria (rhizobia). However, insufficient attention has been paid to the study of the biodiversity and symbiotic efficiency of Arctic rhizobia in Russia. The present work describes for the first time 13 strains of the order *Hyphomicrobiales* (formerly *Rhizobiales*) isolated from nodules of *Oxytropis taimyrensis*, *Astragalus frigidus* and *A. tugarinovii* growing in Arctic Yakutia. The ability of nine rhizobial strains *Rhizobium* sp. 7/1-1, 19-1/1, 20-1/1 and 33-1/1, *R. giardinii* 20/1-1, *M. norvegicum* 20/1-4 and *Mesorhizobium* sp. 9-4/1, 25-2/1 and 32-2/1 to nodulate the wild Arctic legumes *Oxytropis adamsiana* and *Astragalus frigidus* and the fodder legumes *Trifolium repens* and *Medicago sativa* was investigated under the conditions of a sterile test-tube experiment. The aim of the work was to isolate and study the genetic diversity of strains of the order *Hyphomicrobiales* isolated from nodules of the wild legumes *Oxytropis taimyrensis* (Jurtz.) A. et D. Love, *Astragalus frigidus* (L.) A. Gray and *Astragalus tugarinovii* Basil, collected in the Arctic zone of Yakutia, and to determine the ability of rhizobial strains to form nitrogen-fixing nodules on the roots of fodder and wild legumes *Trifolium repens* L., *Medicago sativa* L., *Oxytropis adamsiana* (Trautv.) Jurtzev and *Astragalus frigidus* (L.) A. Gray under the conditions of a sterile test-tube cross-nodulation experiment. Root nodules of wild populations of *O. taimyrensis*, *A. frigidus*, *A. tugarinovii* were collected in 2021 near the lake Sevastyan-Kyule and on Tit-Ary during the Russian-German expedition to the Lena River Delta. Rhizobial strains were isolated from legume nodules by standard methods using mannitol-yeast YMA nutrient medium. Genomic DNA was isolated from pure cultures using the DNeasy Blood&Tissue Kit (QIAGEN, Germany) and Monarch® (New England Biolabs, USA). The primary identification of the strains was carried out by PCR followed by sequencing of the 16S rRNA marker gene (*rrs*) fragment (900-1400 bp). The ability of nine Arctic strains of the genera *Rhizobium* and *Mesorhizobium* to form nitrogen-fixing nodules on the roots of *Trifolium repens* L., *Medicago sativa* L., *O. adamsiana* and *A. frigidus* was studied under the conditions of sterile test-tube experiment. The strains studied were isolated in the present work and previously from nodules of the Arctic legumes *Lathyrus palustris* L., *Vicia cracca* L. and *Hedysarum arcticum* B. Fedtsch growing in the Lena River delta. Plants were grown in sterile 50 ml glass vessels containing 3 g vermiculite and 6 ml of Krasilnikov-Korenyako medium. Seedlings were inoculated with suspensions of individual strains at 10⁶ cells/vessel. Commercial strains of *Rhizobium leguminosarum* RCAM1365 and *Sinorhizobium meliloti* RCAM1750 from the Russian Collection of Agricultural Microorganisms (RCAM, ARRIAM, St. Petersburg) were used as positive controls. Non-inoculated plants were used as negative controls. At the end of cultivation, nodules were counted and crude plant biomass was determined. Nitrogen fixation activity was determined by the acetylene method using a GC-2014 gas chromatograph (Shimadzu, Japan). The obtained isolates were assigned to the genera *Rhizobium* (family *Rhizobiaceae*), *Mesorhizobium* (family *Phyllobacteriaceae*), *Bosea* (family *Boseaceae*) and *Tardiphaga* (family *Bradyrhizobiaceae*). The strains *Rhizobium* sp. 7/1-1, *Tardiphaga robiniae* 7/2-2 and 7/4-2 were isolated from *A. tugarinovii*, the strains *Mesorhizobium* sp. 25-2/1, 25A/5-1, *Bosea* sp. 25A/1-3, *B. lathyri* 25A/2-1, *B. psychrotolerans* 25A/2-2 and 25A/4-1 were isolated from *A. frigidus*, whereas the strains *Mesorhizobium* sp. 9-4/1, *T. robiniae* 9/1-5, 9/3-1 and 9/5-1 were isolated from nodules of *O. taimyrensis*. Under sterile test-tube experiments the strain *R. giardinii* 20/1-1 did not form nodules in any of the inoculation variants, whereas the other eight strains were able to form both ineffective and nitrogen-fixing nodules depending on the legume inoculation variant. With respect to the native Arctic species *O. adamsiana* and *A. frigidus*, strains isolated from native legumes (*O. taimyrensis*, *A. frigidus*, *H. arcticum*) were more active, whereas the cultivated plants *M. sativa* and *T. repens* were more responsive to inoculation with strains isolated from introduced plants *L. palustris* and *V. cracca*. The ability of *O. adamsiana* to form an effective symbiosis with *M. norvegicum* 20/1-4, *Mesorhizobium* sp. 9-4/1 and 25-2/1, isolated from representatives of the legume genera *Hedysarum*, *Oxytropis* and *Astragalus*, respectively, indicates a low host specificity of this plant species, which may presumably allow it to use the resource potential of a wide range of symbiotic microorganisms inhabiting the soil of various Arctic regions. The *O. adamsiana* species is widespread in the Far North and is an important high-protein component of the diet of local animals, which makes it a promising species for the establishment of perennial pasture and hay phytocenoses in extreme Arctic conditions.

Keywords: Arctic Yakutia, legumes, pasture and hay agrophytocenoses, legume-rhizobial symbiosis, nitrogen-fixing nodule bacteria.

REFERENCES

1. Unc A., Altdorff D., Abakumov E., Adl S., Baldursson S., Bechtold M., Cattani D., Firbank L., Grand S., Gudjonsdottir M., Kallenbach C., Kadir A., Li P., McKenzie D., Misra D., Naganano H., Neher D., Niemi J., Oelbermann M., Borchard N. Expansion of agriculture in northern cold-climate regions: a cross-sectoral perspective on opportunities and challenges. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2021, 5: 663448 (doi: 10.3389/fsufs.2021.663448).
2. Naydenov N.D. *Nauchnyy vestnik Yamalo-Nenetskogo avtonomnogo okruga*, 2020, 3(108): 12-17 (in Russ.).
3. Surovtsev V.N. *Arktika: ekologiya i ekonomika*, 2023, 13(1): 149-157 (doi: 10.25283/2223-4594-2023-1-149-157) (in Russ.).
4. Khantimer I.S. *Sel'skokhozyaystvennoe osvoenie tundry* [Agricultural development of the tundra]. Leningrad, 1974 (in Russ.).
5. Kamelin R.V. *Flora Zemli: floristicheskoe rayonirovanie sushi* [Flora of the Earth: floristic zoning of land]. St. Petersburg, Barnaul, 2017 (in Russ.).
6. Rhodes I., Collins R.P., Evans D.R. Breeding white clover for tolerance to low temperature and grazing stress. *Euphytica*, 1994, 77: 239-242 (doi: 10.1007/BF02262636).
7. Roumiantseva M.L., M.E. Vladimirova, V.S. Muntyan, G.V. Stepanova, A.S. Saksaganskaya, A.P. Kozhemyakov, A.G. Orlova, A. Becker, B.V. Simarov Highly effective root nodule inoculants of alfalfa (*Medicago varia* L.): molecular-genetic analysis and practical usage in cultivar creation. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya* [Agricultural Biology], 2019, 54(6): 1306-1323 (doi: 10.15389/agrobiol.2019.6.1306rus).
8. *Kormovye rasteniya senokosov i pastbishch SSSR. Tom 2. Dvudol'nye (Khlorantovyye – Bobovyye) /Pod redaktsiy I.V. Larina* [Forage plants of hayfields and pastures of the USSR. Volume 2. Dicotyledons (Chloranthophytes – Legumes). I.V. Larin (ed.)]. Leningrad, 1951 (in Russ.).
9. Rozenfel'd S.B. *Pitanie kazarok i gusey v Rossiyskoy Arktike* [Feeding of brants and geese in the Russian Arctic]. Moscow, 2009 (in Russ.).
10. Sekretareva N.A. *Sosudistyye rasteniya Rossiyskoy Arktiki i sopredel'nykh territoriy* [Vascular plants of the Russian Arctic and adjacent territories]. Moscow, 2004 (in Russ.).
11. Malyshev L.I. *Turczaninowia*, 2008, 11(3): 5-141 (in Russ.).
12. Kholina A.B., Artyukova E.V., Yakubov V.V., Khoreva M.G., Mochalova O.A., Sandanov D.V., Selyutina I.Yu. *Izvestiya Rossiyskoy akademii nauk. Seriya biologicheskaya*, 2023, 1: 11-21 (doi: 10.31857/S1026347023010067) (in Russ.).
13. Spiridonov A.M. *Mnogoletnie bobovyye travy v zemledelii i kormoproizvodstve Severo-Zapada RF: monografiya* [Perennial legumes in agriculture and forage production in the North-West of the Russian Federation: monograph]. Moscow, Berlin, 2021 (doi: 10.23681/618741) (in Russ.).
14. *Ekologicheskie osnovy upravleniya produktivnost'yu agrofytotsenozov vostochnoevropeyskoy tundry /Pod redaktsiy I.B. Arhegovoy, M.V. Getsen* [Ecological bases of productivity management of agrophytocenoses of the Eastern European tundra. I.B. Arhegova, M.V. Getsen (eds.)]. Leningrad, 1991 (in Russ.).
15. Kotelina N.S., Arhegova I.B., Romanov G.G., Turubanova L.P. *Osobennosti prirodopol'zovaniya i perspektivy prirodovosstanovleniya na Kraynem Severe Rossii* [Peculiarities of nature management and prospects for nature restoration in the Far North of Russia]. Ekaterinburg, 1998 (in Russ.).
16. Beermann F., Teltewskoi A., Fiencke C., Pfeiffer E.-M., Kutzbach L. Stoichiometric analysis of nutrient availability (N, P, K) within soils of polygonal tundra. *Biogeochemistry*, 2015, 122: 211-227 (doi: 10.1007/s10533-014-0037-4).
17. Provorov N.A., Vorob'ev N.I. *Geneticheskie osnovy evolyutsii rastitel'no-mikrobnogo simbioza /Pod redaktsiy I.A. Tikhonovicha* [Genetic basis of the evolution of plant-microbe symbiosis. I.A. Tikhonovich (ed.)]. St. Petersburg, 2012 (in Russ.).
18. Efrome R.C., Rosu C.M., Stedel C., Stefan A., Sirbu C., Gorgan L.D., Labrou N.E., Flemetakis E. Molecular diversity and phylogeny of indigenous *Rhizobium leguminosarum* strains associated with *Trifolium repens* plants in Romania. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2018, 111: 135-153 (doi: 10.1007/s10482-017-0934-3).
19. Youseif S.H., El-Megeed F.H.A., Mohamed A.H., Ageez A., Veliz E., Martinez-Romero E. Diverse *Rhizobium* strains isolated from root nodules of *Trifolium alexandrinum* in Egypt and symbiobars. *Systematic and Applied Microbiology*, 2021, 44(1): 126-156 (doi: 10.1016/j.syapm.2020.126156).
20. Kang W., Xu L., Jiang Z., Shi S. Genetic diversity and symbiotic efficiency difference of endophytic rhizobia of *Medicago sativa*. *Canadian Journal of Microbiology*, 2019, 65(1): 68-83 (doi: 10.1139/cjm-2018-0158).
21. 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*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12): 4748-4758 (doi: 10.1128/aem.63.12.4748-

- 4758.1997).
22. Ampomah O.Y., Mousavi S.A., Lindstrom K., Huss-Danell K. Diverse *Mesorhizobium* bacteria nodulate native *Astragalus* and *Oxytropis* in arctic and subarctic areas in Eurasia. *Systematic and applied microbiology*, 2017, 40(1): 51-58 (doi: 10.1016/j.syapm.2016.11.004).
 23. Wdowiak S., Malek W. Numerical analysis of *Astragalus cicer* microsymbionts. *Current Microbiology*, 2000, 41: 142-148 (doi: 10.1007/s002840010108).
 24. Kuznetsova I.G., Sazanova A.L., Safronova V.I., Pinaev A.G., Verkhovina A.V., Tikhomirova N.Y., Osledkin Y.S., Belimov A.A. Genetic diversity among microsymbionts of *Lathyrus*, *Vicia*, *Oxytropis* and *Astragalus* legume species from Baikal region. *Agricultural Viology*, 2015, 50(3): 345-352 (doi: 10.15389/agrobiol.2015.3.345eng).
 25. Safronova V.I., Guro P.V., Sazanova A.L., Kuznetsova I.G., Belimov A.A., Yakubov V.V., Chirak E.R., Afonin A.M., Gogolev Y.V., Andronov E.E., Tikhonovich I.A. Rhizobial microsymbionts of Kamchatka *Oxytropis* species possess genes of the Type III and VI secretion systems, which can affect the development of symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2020, 33(10): 1232-1241 (doi: 10.1094/MPMI-05-20-0114-R).
 26. 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).
 27. Karlov D.S., Guro P.V., Sazanova A.L. I.G. Kuznetsova, N.Yu. Tikhomirova, N.N. Laschinsky, Pavlov I.S., Belimov A.A., Safronova V.I. Study of the genetic diversity and symbiotic efficiency of microsymbionts isolated from *Lathyrus palustris* L. and *Vicia cracca* L. growing in Arctic Yakutia. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2023, 58(3): 403-415 (doi: 10.15389/agrobiol.2023.3.403rus).
 28. Bol'shiyanov D.Yu., Savel'eva L.A., Pestryakova L.A., Vakhrameeva P.S., Baranskaya A.V. *Izvestiya Russkogo geograficheskogo obshchestva*, 2013, 145(2): 49-65 (in Russ.).
 29. Ivanova E.I. *Vestnik SVFU*, 2012, 9(3): 52-57 (in Russ.).
 30. Isaev A.P., Gabysheva L.P., Mikhaleva L.G., Solomonov N.G. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*, 2016, 6: 527 (in Russ.).
 31. Martínez-Hidalgo P., Ramírez-Bahena M.H., Flores-Félix J.D., Rivas R., Igual J.M., Mateos P.F., Martínez-Molina E., León-Barrios M., Peix Á., Velázquez E. Revision of the taxonomic status of type strains of *Mesorhizobium loti* and reclassification of strain USDA 3471T as the type strain of *Mesorhizobium erdmanii* sp. nov. and ATCC 33669T as the type strain of *Mesorhizobium jarvisii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(Pt6): 1703-1708 (doi: 10.1099/ijs.0.000164).
 32. De Meyer S.E., Andrews M., James E.K., Willems A. *Mesorhizobium carmichaelinearum* sp. nov., isolated from *Carmichaelia* spp. root nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69(1): 146-152 (doi: 10.1099/ijsem.0.003120).
 33. Lu Y.L., Chen W.F., Wang E.T., Han L.L., Zhang X.X., Chen W.X., Han S.Z. *Mesorhizobium shangrilense* sp. nov., isolated from root nodules of *Caragana* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(12): 3012-3018 (doi: 10.1099/ijs.0.007393-0).
 34. Zheng W.T., Li Y. Jr., Wang R., Sui X.H., Zhang X.X., Zhang J.J., Wang E.T., Chen W.X. *Mesorhizobium qingshengii* sp. nov., isolated from effective nodules of *Astragalus sinicus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(6): 2002-2007 (doi: 10.1099/ijs.0.044362-0).
 35. 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).
 36. Albert R.A., McGuine M., Pavlons S.C., Roecker J., Bruess J., Mossman S., Sun S., King M., Hong S., Farrance C.E., Danner J., Joung Y., Shapiro N., Whitman W.B., Busse H.J. *Bosea psychrotolerans* sp. nov., a psychrotrophic alphaproteobacterium isolated from Lake Michigan water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69(5): 1376-1383 (doi: 10.1099/ijsem.0.003319).
 37. 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).
 38. Pulido-Suárez L., Flores-Félix J.D., Socas-Pérez N., Igual J.M., Velázquez E., Peix 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).
 39. 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).
40. Kuznetsova I.G., Karlov D.S., Sazanova A.L., Guro P.V., Alekhina I. A., Tikhomirova N.Yu., Pospelov I. N., Pospelova E.B., Belimov A.A., Safronova V.I. Genetic diversity of microsymbionts of legumes *Lathyrus pratensis* L., *Vicia cracca* L., *Trifolium repens* L., and *Astragalus schelichowii* Turcz. growing near Norilsk in Arctic Russia. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2023, 70(8): 187 (doi: 10.1134/S1021443723602161).
 41. De Meyer S.E., Coorevits A., Willems A. *Tardiphaga robiniae* gen. nov., sp. nov., a new genus in the family *Bradyrhizobiaceae* isolated from *Robinia pseudoacacia* in Flanders (Belgium). *Systematic and Applied Microbiology*, 2012, 35(4): 205-214 (doi: 10.1016/j.syapm.2012.02.002).
 42. Karlov D.S., Guro P.V., Kuznetsova I.G., Sazanova A.L., Alekhina I.A., Tikhomirova N.Yu., Lashchinsky N.N., Belimov A.A., Safronova V.I. Genetic identification of microsymbionts of the legume *Hedysarum arcticum* B. Fedtsch, growing on Samoylov Island in the Lena River Delta (Arctic Zone of Yakutia), Russia. *Microbiology*, 2024, 93: 380-384 (doi: 10.1134/S0026261723604220).
 43. Kriss A.E., Korenyako A.I., Migulina V.M. *Mikrobiologiya*, 1941, 10(1): 61-71 (in Russ.).
 44. Prévost D., Bromfield E.S.P. Effect of low root temperature on symbiotic nitrogen fixation and competitive nodulation of *Onobrychis viciifolia* (sainfoin) by strains of arctic and temperate rhizobia. *Biol. Fertil. Soils*, 1991, 12(3): 161-164.
 45. Prévost D., Drouin P., Laberge S., Bertrand A., Cloutier J., Lévesque G. Cold-adapted rhizobia for nitrogen fixation in temperate regions. *Canadian Journal of Botany*, 2003, 81(12): 1153-1161 (doi: 10.1139/b03-113).
 46. Gage D.J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing *Rhizobia* during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(2): 280-300 (doi: 10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004).
 47. Ghobakhlou A.F., Johnston A., Harris L., Antoun H., Laberge S. Microarray transcriptional profiling of Arctic *Mesorhizobium* strain N33 at low temperature provides insights into cold adaptation strategies. *BMC Genomics*, 2015, 16: 383 (doi: 10.1186/s12864-015-1611-4).