

СИМБИОТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ АРКТИЧЕСКИХ ШТАММОВ РИЗОБИЙ НА ГОРОШКЕ (*Vicia* L.), КОПЕЕЧНИКЕ (*Hedysarum* L.), АСТРАГАЛЕ (*Astragalus* L.) И ОСТРОЛОДОЧНИКЕ (*Oxytropis* DC.) В ВЕГЕТАЦИОННОМ ОПЫТЕ*

И.Г. КУЗНЕЦОВА[✉], П.В. ГУРО, А.Л. САЗАНОВА, Э.А. СЕКСТЕ, О.С. ЮЗИХИН, Н.Ю. ТИХОМИРОВА, А.А. БЕЛИМОВ, В.И. САФРОНОВА, Д.С. КАРЛОВ

Растительно-микробные взаимоотношения, в частности бобово-ризобиальный симбиоз, играют одну из ключевых ролей в развитии сельского хозяйства. Особую значимость эта роль приобретает при создании устойчивого земледелия на арктических территориях России в экстремальных почвенно-климатических условиях. Изучение таксономического разнообразия арктических ризобий и их симбиотической активности в отношении различных видов бобовых растений позволяет определить хозяйскую специфичность штаммов и выявить наиболее эффективные азотфиксаторы, адаптированные к северным условиям. В настоящей работе впервые в условиях вегетационных опытов показана симбиотическая эффективность арктических штаммов *Rhizobium beringeri* P8/5-2, *Rhizobium* sp. 20-1/1, *Mesorhizobium norvegicum* 20/1-4 и *Mesorhizobium* sp. 9-4/1 и 25-2/1 на клубеньковых кормовых растениях *Vicia sativa* и *V. cracca*, а также на дикорастущих бобовых *Hedysarum arcticum*, *Astragalus frigidus* и *Oxytropis adamsiana*. Целью работы было изучение способности ранее селектированных арктических ризобиальных штаммов *Rhizobium* и *Mesorhizobium* из порядка *Hyphomicrobiales* формировать азотфиксирующий симбиоз с кормовыми викой посевной (*Vicia sativa* L.) и викой мышиной (*V. cracca* L.) и дикорастущими арктическими бобовыми копеечником арктическим (*Hedysarum arcticum* B. Fedtsch), астрагалом холодным (*Astragalus frigidus* (L.) A. Gray) и остролодочиком Адамса (*Oxytropis adamsiana* (Trautv.) Jurtzev) в условиях вегетационного опыта по кросс-нодуляции. Работу проводили в лаборатории ФГБНУ ВНИИСХМ (г. Санкт-Петербург) в 2024 году. Семена дикорастущих популяций бобовых растений *V. cracca*, *H. arcticum*, *O. adamsiana* и *A. frigidus* были собраны на о. Самойловский и о. Тит-Ары в 2021 году. Семена кормовой раннеспелой вики посевной (яровой) сорта Приобская 25 были приобретены у агрофирмы «Аэлит» (Россия). Штаммы *Rhizobium beringeri* P8/5-2 (RCAM06326), *Rhizobium* sp. 20-1/1 (RCAM05664), *Mesorhizobium norvegicum* 20/1-4 (RCAM05519), *Mesorhizobium* sp. 9-4/1 (RCAM06350) и 25-2/1 (RCAM06353) были предоставлены Сетевой биоресурсной коллекцией в области генетических технологий для сельского хозяйства (ФГБНУ ВНИИСХМ, г. Санкт-Петербург). Они были выделены из клубеньков арктических бобовых *Lathyrus pratensis*, *V. cracca*, *H. arcticum*, *A. frigidus* и *O. taimyrensis*. Растения *V. sativa* и *V. cracca* культивировали в пластиковых контейнерах объемом 2 л, содержащих 2 кг стерильного песка. Растения *H. arcticum*, *O. adamsiana* и *A. frigidus* выращивали в пластиковых стаканах объемом 200 мл, содержащих 300 г стерильного песка. Контейнеры, содержащие по 7-8 проростков, и стаканы с 3 проростками, инокулировали суспензиями индивидуальных штаммов в количестве 10^6 клеток на сосуд. Положительным контролем для *Vicia* служил коммерческий штамм *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM0626. Неинокулированные растения были использованы в качестве отрицательного контроля. Растения выращивали в климатической камере MLR-352H («РНСби», Япония). После окончания культивирования сырую биомассу побегов и корней взвешивали и считали число образовавшихся клубеньков. Азотфиксирующую активность клубеньков определяли ацетиленовым методом с помощью газового хроматографа GC-2014 («Shimadzu», Япония). Показана способность штамма *R. beringeri* P8/5-2 образовывать эффективный симбиоз с кормовыми бобовыми *V. sativa* и *V. cracca*, а после инокуляции дикорастущих арктических видов *A. frigidus*, *O. adamsiana* и *H. arcticum*, несмотря на отсутствие клубеньков, этот штамм приводил к достоверно более высоким значениям общей сырой массы растений в сравнении с отрицательным контролем. Штамм *M. norvegicum* 20/1-4 образовал эффективный симбиоз с *H. arcticum*, *O. adamsiana* и *A. frigidus*, однако после инокуляции этих видов бобовых штаммом *Mesorhizobium* sp. 9-4/1 симбиоз был наиболее эффективным. Так, прибавка общей массы растений *A. frigidus* составила от 13 до 37 %, *O. adamsiana* — от 32 до 174 %, тогда как *H. arcticum* — от 48 до 72 % в сравнении с остальными вариантами. При инокуляции растения-хозяина *V. cracca* штаммом *Rhizobium* sp. 20-1/1 симбиоз был эффективным, показав более высокие значения общей биомассы (прибавка составила 39 %), числа клубеньков и азотфиксирующей активности по сравнению с коммерческим штаммом *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM0626. Таким образом, арктические штаммы *Rhizobium* sp. 20-1/1 и *Mesorhizobium* sp. 9-4/1 перспективны для дальнейших испытаний в условиях полевых опытов с

* Работа проводилась 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).

целью создания на их основе высокоэффективных микробных препаратов для использования в северных регионах России при возделывании кормового бобового растения *V. cracca* и дикорастущих пастбищных бобовых, представителей родов *Hedysarum*, *Oxytropis* и *Astragalus*, как компонентов высокопродуктивных многолетних пастбищных и сенокосных сеяных лугов.

Ключевые слова: Арктический регион, *Vicia*, *Astragalus*, *Hedysarum*, *Oxytropis*, бобово-ризобиальный симбиоз, азотфиксирующие клубеньковые бактерии.

Обеспечение устойчивого развития сельского хозяйства в Арктической зоне России представляет собой нетривиальную задачу ввиду очень непростых климатических и экологических условий в этом регионе. Однако возможные изменения климата могут привести к большей доступности арктических территорий, что открывает значительные экономические перспективы (1, 2). Существенный интерес представляют механизмы и закономерности адаптации организмов к экстремальным высокоширотным условиям Севера. В таких исследованиях арктические виды растений служат модельными объектами (3, 4).

Роль бобовых в экосистемах Арктики во многом определяется их биоценотическими и симбиотическими связями. Способность бобовых к симбиозу с азотфиксирующими бактериями позволяет им осваивать обедненные почвы и щебнистые осыпи, которые широко распространены на Севере (1, 3). Хозяйственная ценность бобовых определяется высокой урожайностью, хорошими кормовыми достоинствами, поедаемостью зеленой массы, сена и соломы, а также положительным эффектом при севооборотах.

Вика посевная (*Vicia sativa* L.) представляет собой ценное кормовое растение, поскольку отвечает всем предъявляемым требованиям. Кормовые достоинства зеленой массы вики заметно превосходят гороховую, она содержит меньше клетчатки, долго не грубеет и поедается всеми видами животных (5). Недавно был обоснован агроклиматический потенциал возделывания вики посевной в условиях Центральной Якутии (6).

К бобовым растениям, перспективным для внедрения в арктические многолетние фитоценозы относится и вика мышиная (*Vicia cracca* L.). Этот вид обладает широкой биологической пластичностью, имеет обширный палеоарктический ареал и по химическому составу не уступает лучшим кормовым травам (7). Сорта *V. cracca* входят в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию, и активно культивируются в качестве ценной кормовой травы в пастбищных и сенокосных фитоценозах (8).

В умеренных и арктических зонах России широко представлены растения из родов Копеечник (*Hedysarum* L.), Остролодочник (*Oxytropis* DC.) и Астрагал (*Astragalus* L.), которые входят в рацион питания различных животных и птиц (9, 10). Так, холодоустойчивое бобовое *Astragalus frigidus* (L.) A. Gray широко распространено за полярным кругом, эту высокобелковую кормовую культуру поедают северные олени (9). Вид *Oxytropis adamsiana* (Trautv.) Jurtzev распространен в арктической тундре, редколесьях, в высокогорьях на каменистых склонах, осыпях, и по берегам горных рек. Растение хорошо поедается травоядными животными (10). Вид включен в состав коллекции Якутского ботанического сада Института биологических проблем криолитозоны СО РАН (г. Якутск, Республика Саха) и изучается в качестве перспективного для дальнейшей интродукции в условиях резко континентального климата Якутии (11). Копеечник арктический (*Hedysarum arcticum* B. Fedtsch.) представляет интерес для введения в состав бобово-злаковых агрофитоценозов в северных регионах России. Была показана высокая биологическая продуктивность естественных растительных сообществ с преобладанием *H. arcticum* по сравнению с фитоценозами,

основанными на других местных видах бобовых в условиях Большеземельской тундры (12).

Известно, что для представителей рода *Vicia* наиболее характерны симбиотические отношения с различными штаммами вида *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Однако описаны и другие микросимбионты, относящиеся к родам *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Bosea* и *Tardiphaga*, которых можно обнаружить в клубеньках вики (13–17). В частности, из клубеньков *V. cracca*, произрастающей в арктическом регионе России, были выделены штаммы *R. herbae* и *B. psychrotolerans* (17). Показано, что представители *Astragalus* и *Oxytropis* обладают широким разнообразием микросимбионтов, относящихся к родам *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bosea* и *Tardiphaga* (17–22). Так, для *Astragalus frigidus* из Арктической зоны Якутии описаны представители родов *Mesorhizobium* и *Bosea* (17), тогда как для растений *O. adamsiana*, собранных в дельте реки Лены и на плато Путорана, выделенные штаммы были отнесены к *Pararhizobium*, *Neorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Bosea* и *Tardiphaga* (данные не опубликованы). Судя по данным литературы, растения рода *Hedysarum* нодулируются видами, родственными *Rhizobium* и *Mesorhizobium* (23, 24). В то же время в качестве микросимбионтов копеечника щетинистого (*Hedysarum gmelinii* Ledeb. subsp. *setigerum*), произрастающего в Байкальском регионе, были описаны представители *Phyllobacterium* и *Bosea*, а из бобового растения *H. arcticum*, произрастающего в арктической Якутии, были выделены микросимбионты *R. giardinii* и *M. norvegicum* (25).

Эффективность возделывания бобовых растений зависит не только от параметров почвенно-климатической зоны, но и правильного подбора микросимбионта. Так, формирование растительно-микробной системы, включающей виды (сорта) растений и комплементарные им бактериальные штаммы, позволяет повысить адаптивность макросимбионта к условиям возделывания и прибавку урожайности. Для увеличения продуктивности бобово-ризобиального взаимодействия подбирают наиболее эффективные пары из уже существующих сортов и штаммов или проводят сопряженную селекцию, которая заключается в одновременном создании исходного сорта растения и генетически подходящего ему комплементарного штамма полезных микроорганизмов (26). Арктические виды бобовых растений и их микросимбионты уже адаптированы к почвенно-климатическим условиям Крайнего Севера, поэтому изучение хозяйской специфичности и симбиотической эффективности арктических ризобий в отношении растений-хозяев важно для развития сельского хозяйства в условиях Крайнего Севера.

В настоящей работе впервые в условиях вегетационных опытов показана симбиотическая эффективность арктических штаммов *Rhizobium beringeri* P8/5-2, *Rhizobium* sp. 20-1/1, *Mesorhizobium norvegicum* 20/1-4 и *Mesorhizobium* sp. 9-4/1 и 25-2/1 на клубеньковых кормовых растениях *Vicia sativa* и *V. cracca*, а также на дикорастущих бобовых *Hedysarum arcticum*, *Astragalus frigidus* и *Oxytropis adamsiana*.

Целью работы было изучение способности ранее селектированных арктических ризобиальных штаммов *Rhizobium* и *Mesorhizobium* из порядка *Hyphomicrobiales* формировать азотфиксирующий симбиоз с кормовыми ви- кой посевной (*Vicia sativa* L.) и ви- кой мышинной (*V. cracca* L.) и дикорастущими арктическими бобовыми копеечником арктическим (*Hedysarum arcticum* V. Fedtsch), астрагалом холодным (*Astragalus frigidus* (L.) A. Gray) и остролодочником Адамса (*Oxytropis adamsiana* (Trautv.) Jurtzev) в условиях вегетационного опыта по кросс-нодуляции.

Методика. Для постановки вегетационного опыта по кросс-нодуля-

ции (2024 год) использовали семена дикорастущих арктических (*V. cracca*, *H. arcticum*, *O. adamsiana* и *A. frigidus*) и культурных (*V. sativa*) бобовых растений, а также пять арктических ризобияльных штаммов из рода *Rhizobium* и *Mesorhizobium*.

Семена дикорастущих популяций бобовых растений *V. cracca*, *H. arcticum*, *O. adamsiana* и *A. frigidus* были собраны на о. Самойловский (72°22'00"N 126°30'0"E) и о. Тит-Ары (71°57'32"N 127°05'53"E) в ходе российско-немецкой экспедиции в дельту р. Лены (арктическая зона Республики Саха — Якутия) в 2021 году. Семена кормовой раннеспелой вики посевной (яровой) сорта Приобская 25 приобретены у агрофирмы «Аэлита» (Россия).

Штаммы *Rhizobium beringeri* P8/5-2 (RCAM06326), *Rhizobium* sp. 20-1/1 (RCAM05664), *Mesorhizobium norvegicum* 20/1-4 (RCAM05519), *Mesorhizobium* sp. 9-4/1 (RCAM06350) и 25-2/1 (RCAM06353) были предоставлены Сетевой биоресурсной коллекцией в области генетических технологий для сельского хозяйства Всероссийского НИИ сельскохозяйственной микробиологии (ФГБНУ ВНИИСХМ, г. Санкт-Петербург) (<https://arriam.ru/kollekciya-kultur1/>). Ранее эти штаммы были выделены из клубеньков арктических бобовых *Lathyrus pratensis*, *V. cracca*, *H. arcticum*, *A. frigidus* и *O. taimyrensis* (17, 25, 27, 28).

Семена растений скарифицировали и обрабатывали 98 % раствором серной кислоты (H_2SO_4) в течение 5 мин (семена копечника, астрагала и остролодочника) и 10 мин (семена вики), после чего их дважды промывали стерильной водопроводной водой в течение 15 мин. Эффективность обработки контролировали, высевая часть семян на чашки Петри с мясопептонным агаром (МПА) и бобовым агаром с последующей инкубацией при 28 °C в течение 72 ч. Отсутствие роста микроорганизмов подтверждало стерильность семян. Проращивали семена на фильтровальной бумаге в чашках Петри при 25 °C в темноте в течение 3-5 сут (в зависимости от вида растения).

Растения *V. sativa* и *V. cracca* культивировали в пластиковых контейнерах объемом 2 л, содержащих 2 кг стерильного песка. Растения *H. arcticum*, *O. adamsiana* и *A. frigidus* выращивали в пластиковых стаканах объемом 200 мл, содержащих 300 г стерильного песка. В каждый контейнер добавляли 400 мл, в стакан — 60 мл среды Красильникова-Кореньяко (K_2HPO_4 — 1,0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 1,0, $Ca_3(PO_4)_2$ — 0,2, $FeSO_4$ — 0,02 г/л), а также смесь микроэлементов по М.В. Федорову (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) объемом 40 мл на контейнер и 10 мл на стакан.

Контейнеры с 7-8 проростками в каждом и стаканы с 3 проростками инокулировали суспензиями индивидуальных штаммов в количестве 10^6 клеток на сосуд. Каждый вариант инокуляции *V. sativa* и *V. cracca* был представлен 14 повторностями, тогда как варианты *H. arcticum*, *O. adamsiana* и *A. frigidus* — по 6 повторностей. Положительным контролем для *Vicia* служил коммерческий штамм *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM0626 из Сетевой биоресурсной коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства (ФГБНУ ВНИИСХМ, г. Санкт-Петербург). Неинокулированные растения использовали в качестве отрицательного контроля.

Растения выращивали в климатической камере MLR-352H («PHCbi», Япония) при 18-22 °C в течение 30 сут при относительной влажности 50 % и четырехуровневом режиме освещения/температуры: ночь (18 °C, 8 ч), утро (200 мкмоль квантов $\cdot m^{-2} \cdot c^{-1}$, 20 °C, 2 ч), день (400 мкмоль квантов $\cdot m^{-2} \cdot c^{-1}$, 23 °C, 12 ч), вечер (200 мкмоль квантов $\cdot m^{-2} \cdot c^{-1}$, 20 °C, 2 ч). Освещение осуществлялось лампами L36W/77 FLUORA («Osram Licht AG»,

Германия). После окончания культивирования сырую биомассу побегов и корней взвешивали и подсчитывали образовавшиеся клубеньки. Азотфиксирующую активность клубеньков определяли ацетиленовым методом с помощью газового хроматографа GC-2014 («Shimadzu», Япония).

Реизоляты выделяли общепринятыми микробиологическими методами (28). Принадлежность реизолятов к интродуцированным штаммам проверяли методом секвенирования последовательностей гена 16S rPHK (1400 п.н.).

Геномную ДНК из чистых культур выделяли с помощью наборов DNeasy Blood&Tissue kit («QIAGEN N.V.», Германия). Для амплификации использовали пару праймеров fD1 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' и rD1 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3' (29). Состав реакционной смеси для ПЦР: 38 мкл milli-Q H₂O (ОАО «Евроген», Россия), 5 мкл буфера («Хеликон», Россия), 5 мкл набора dNTP (ОАО «Евроген», Россия), по 0,5 мкл праймеров fD1 и rD1 (ОАО «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). Условия ПЦР 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). Размер и количество амплифицированных фрагментов ДНК оценивали визуально с помощью электрофореза в 1,0 % агарозном геле в 0,5× TAE-буфере с использованием маркера молекулярных масс MassRuler («Fermentas», Литва). Очистку ПЦР-продукта из агарозного геля осуществляли с помощью набора Cleanup S-Cap (ОАО «Евроген», Россия).

Секвенирование по Сэнгеру проводили на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xl («Life Technologies», США) на базе Центра коллективного пользования «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» Всероссийского НИИ сельскохозяйственной микробиологии. Полученные последовательности анализировали с помощью программы ChromasLite 2.6.4 (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>). Последовательности сравнивали с нуклеотидной базой данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), используя программу BLAST.

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

Результаты. Семена и клубеньки дикорастущих бобовых растений, из которых выделены ризобияльные штаммы, были собраны в г. Норильске, на о. Самойловский и о. Тит-Ары (рис. 1.).

На растениях *V. sativa* эффективные клубеньки образовались после инокуляции штаммом *R. beringeri* P8/5-2, однако число клубеньков, азотфиксирующая активность и общая масса растений были достоверно ниже ($p < 0,05$) в сравнении с коммерческим штаммом *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM0626. После инокуляции *Rhizobium* sp. 20-1/1 формировались неэффективные клубеньки, однако общая сырая биомасса была ниже в сравнении с вариантом без инокуляции (табл. 1).

На растениях *V. cracca* азотфиксирующие клубеньки были обнаружены в вариантах с инокуляцией *R. beringeri* P8/5-2 и *Rhizobium* sp. 20-1/1, при этом оба варианта обработки характеризовались достоверно более высо-

кими значениями ($p < 0,05$) симбиотических параметров (числа клубеньков, общей сырой биомассы и азотфиксирующей активности) в сравнении со штаммом *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM0626. Отметим, что после инокуляции *Rhizobium* sp. 20-1/1 наблюдались достоверно более высокие значения сырой биомассы растений и азотфиксирующей активности в сравнении с *R. beringeri* P8/5-2 (см. табл. 1).



Места сбора семян и клубеньков дикорастущих бобовых растений в г. Норильске (Красноярский край), на о. Самойловский и о. Тит-Ары (дельта реки Лены, Северная Якутия). Карта с сайта <https://nakarte.me> (ESRI Sputnik), 2025.

1. Эффект инокуляции бобовых растений *Vicia sativa* и *V. cracca* арктическими изолятами из рода *Rhizobium* и коммерческим штаммом *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM0626 в условиях вегетационного опыта ($n = 14$, $M \pm SEM$; вегетационный опыт, 2024 год)

| Вариант инокуляции | Число клубеньков на растение | Сырая биомасса, мг/растение | | | Ацетилен-редуктазная активность, $\mu\text{моль C}_2\text{H}_4 \cdot \text{растение}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ |
|--|------------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|--|
| | | побег | корень | общая масса | |
| <i>V. sativa</i> | | | | | |
| Без инокуляции | 0 ^d | 81,6±18,69 ^b | 118,9±19,54 ^b | 200,4±19,47 ^c | 0 ^c |
| <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> RCAM0626 | 128,1±20,49 ^b | 161,6±33,52 ^a | 139,4±24,75 ^a | 333,5±71,56 ^a | 10,6±0,42 ^a |
| <i>Rhizobium</i> sp. 20-1/1 | 153,4±33,75 ^a | 86,3±21,55 ^b | 110,5±20,76 ^b | 196,8±39,90 ^c | 0 ^c |
| <i>Rhizobium beringeri</i> P8/5-2 | 76,2±12,70 ^c | 155,6±30,69 ^a | 122,1±23,42 ^{ab} | 277,7±51,89 ^b | 6,0±1,13 ^b |
| <i>V. cracca</i> | | | | | |
| Без инокуляции | 0 ^c | 15,0±1,63 ^b | 10,6±1,51 ^b | 23,9±1,68 ^b | 0 ^d |
| <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> RCAM0626 | 18,3±2,27 ^b | 10,6±1,15 ^c | 10,6±1,55 ^b | 21,3±2,33 ^c | 0,2±0,03 ^c |
| <i>Rhizobium</i> sp. 20-1/1 | 24,2±3,56 ^a | 16,9±1,98 ^a | 12,7±1,55 ^a | 29,6±2,75 ^a | 8,8±0,20 ^a |
| <i>Rhizobium beringeri</i> P8/5-2 | 22,1±2,74 ^a | 10,2±1,26 ^c | 7,9±1,91 ^c | 18,1±2,64 ^d | 3,3±0,05 ^b |

Примечание. Штамм *Rhizobium beringeri* P8/5-2 был идентифицирован на уровне вида в работе I.G. Kuznetsova с соавт. (16).

^a, ^b и ^c Разными латинскими буквами отмечены варианты, различия между которыми статистически значимы (критерий Дункана, $p < 0,05$).

На растениях *H. arcticum* азотфиксирующие клубеньки образовались в вариантах со штаммами *M. norvegicum* 20/1-4 и *Mesorhizobium* sp. 25-2/1, неэффективные клубеньки — с *Mesorhizobium* sp. 9-4/1, тогда как в варианте с *R. beringeri* P8/5-2 клубеньков обнаружено не было. После инокуляции *M. norvegicum* 20/1-4, *Mesorhizobium* sp. 9-4/1 и *R. beringeri* P8/5-2 наблюдались достоверно более высокие значения ($p < 0,05$) для общей биомассы растений в сравнении с отрицательным контролем, тогда как обработка

штаммом *Mesorhizobium* sp. 25-2/1 не приводила к статистически значимому увеличению общей биомассы растений (табл. 2).

2. Эффект инокуляции бобовых растений *Hedysarum arcticum*, *Astragalus frigidus* и *Oxytropis adamsiana* арктическими изолятами из родов *Rhizobium* и *Mesorhizobium* ($n = 6$, $M \pm SEM$; вегетационный опыт, 2024 год)

| Вариант инокуляции | Число клубеньков на растение | Сырая биомасса, мг/растение | | | Ацетилен-редуктазная активность, мкмоль C_2H_4 · растение ⁻¹ · сут ⁻¹ |
|--|------------------------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|---|
| | | побег | корень | общая масса | |
| <i>H. arcticum</i> | | | | | |
| Без инокуляции | 0с | 34,0±4,83 ^d | 38,1±5,43 ^c | 72,1±7,78 ^b | 0 ^b |
| <i>Mesorhizobium norvegicum</i> 20/1-4 | 4,2±0,84 ^a | 54,0±11,40 ^{ab} | 58,0±13,04 ^b | 112,0±22,80 ^a | 0,3±0,02 ^a |
| <i>Mesorhizobium</i> sp. 25-2/1 | 3,4±0,70 ^b | 42,0±4,83 ^{cd} | 42,0±4,83 ^c | 84,0±8,10 ^b | 0,3±0,03 ^a |
| <i>Mesorhizobium</i> sp. 9-4/1 | 4,5±1,01 ^a | 63,3±7,91 ^a | 61,1±6,51 ^{ab} | 124,4±12,86 ^a | 0 ^b |
| <i>Rhizobium beringeri</i> P8/5-2 | 0 ^c | 47,9±13,39 ^{bc} | 68,3±11,36 ^a | 116,2±21,37 ^a | 0 ^b |
| <i>A. frigidus</i> | | | | | |
| Без инокуляции | 0 ^d | 23,3±5,16 ^c | 31,7±7,53 | 55,0±10,49 ^c | 0 ^d |
| <i>Mesorhizobium norvegicum</i> 20/1-4 | 2,5±0,53 ^c | 28,8±4,43 ^b | 36,3±5,18 | 65,0±8,45 ^b | 0,5±0,05 ^b |
| <i>Mesorhizobium</i> sp. 25-2/1 | 5,0±1,10 ^a | 30,8±3,54 ^b | 35,5±3,02 | 66,3±2,07 ^b | 0,2±0,04 ^c |
| <i>Mesorhizobium</i> sp. 9-4/1 | 4,1±0,69 ^b | 35,7±5,35 ^a | 40,0±5,77 | 75,7±8,86 ^a | 1,2±0,10 ^a |
| <i>Rhizobium beringeri</i> P8/5-2 | 0 ^d | 26,9±2,67 ^{bc} | 39,9±5,15 | 66,7±5,38 ^b | 0 ^d |
| <i>O. adamsiana</i> | | | | | |
| Без инокуляции | 0 ^c | 22,0±3,39 ^c | 32,2±4,09 ^b | 54,2±7,40 ^d | 0 ^d |
| <i>Mesorhizobium norvegicum</i> 20/1-4 | 4,1±0,78 ^b | 40,0±6,12 ^b | 37,8±8,33 ^b | 77,8±9,72 ^c | 2,1±0,08 ^c |
| <i>Mesorhizobium</i> sp. 25-2/1 | 4,9±0,60 ^b | 38,9±6,51 ^b | 40,0±7,07 ^b | 78,9±9,93 ^c | 2,6±0,30 ^b |
| <i>Mesorhizobium</i> sp. 9-4/1 | 6,8±1,36 ^a | 86,3±18,47 ^a | 62,5±9,64 ^a | 148,8±23,87 ^a | 6,4±0,82 ^a |
| <i>Rhizobium beringeri</i> P8/5-2 | 0 ^c | 42,0±5,48 ^b | 70,6±7,86 ^a | 112,6±11,92 ^b | 0 ^d |

Примечание. Штамм *Mesorhizobium norvegicum* 20/1-4 был идентифицирован на уровне вида в работе D.S. Karlov с соавт. (25).
a, b, c и d 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.

На *A. frigidus* активные клубеньки обнаружили после инокуляции штаммами *M. norvegicum* 20/1-4, *Mesorhizobium* sp. 25-2/1 и 9-4/1, тогда как после инокуляции *R. beringeri* P8/5-2 клубеньков выявлено не было. Все варианты показали достоверно более высокие значения ($p < 0,05$) сырой биомассы растений по сравнению с отрицательным контролем. При этом штамм *Mesorhizobium* sp. 9-4/1 продемонстрировал наиболее высокие, статистически достоверные значения ($p < 0,05$) сырой биомассы и азотфиксирующей активности в сравнении с остальными вариантами инокуляции.

На *O. adamsiana* эффективные клубеньки образовались после инокуляции *M. norvegicum* 20/1-4, *Mesorhizobium* sp. 25-2/1 и 9-4/1. В варианте с инокуляцией *Mesorhizobium* sp. 9-4/1 отмечали достоверно более высокие значения ($p < 0,05$) для всех исследуемых симбиотических параметров в сравнении с остальными вариантами. Обработка растений штаммами *M. Norvegicum* 20/1-4 и *Mesorhizobium* sp. 25-2/1, а также не формировавшим клубеньков штаммом *R. beringeri* P8/5-2 привела к достоверно более высоким показателям ($p < 0,05$) массы побега и общей массы растений в сравнении с отрицательным контролем.

Все штаммы были повторно реизолированы из клубеньков, а их принадлежность к соответствующему инокуляту подтверждена с помощью секвенирования и анализа сходства маркерного гена 16S rRNA. У всех реизолированных штаммов сходство между собой по гену 16S rRNA варьировало от 93,60 до 99,86 %, тогда как сходство каждого реизолята с соответствующим штаммом-инокулятом составило 100 %.

Настоящее исследование представляет собой продолжение ранее проведенной работы по выделению, идентификации и отбору наиболее перспективных арктических клубеньковых бактерий в условиях стерильных микровегетационных опытов с кормовыми (*V. cracca*, *V. sativa*, *L. sativus*, *L. pratensis*, *T. repens* и *M. sativa*) и дикорастущими (*H. arcticum*, *A. frigidus* и *O. adamsiana*) бобовыми растениями (17, 25, 27, 28).

Штаммы *Rhizobium* sp. 20-1/1 и *R. beringeri* P8/5-2 были выделены нами из клубеньков бобовых, произрастающих в арктических регионах России, — соответственно *V. cracca* и *L. pratensis* (17, 27). Способность штамма *Rhizobium* sp. 20-1/1 формировать эффективный симбиоз с культурными *V. cracca*, *V. sativa*, *T. repens* L. и *Medicago sativa* L., а также дикорастущими бобовыми *O. adamsiana* и *A. frigidus* была изучена ранее в условиях стерильных микровегетационных опытов (МВО) (27, 28). В частности, была показана способность *Rhizobium* sp. 20-1/1 формировать эффективный симбиоз только после инокуляции с *V. cracca*. При этом наблюдалась значительно более высокая азотфиксирующая активность по сравнению с коммерческим штаммом *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM0626, что согласуется с результатами вегетационного опыта на песке в настоящей работе (см. табл. 1).

Однако отметим малую эффективность штамма *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM0626 на растениях *V. cracca*, что, вероятно, связано с узкой специфичностью RCAM0626 к растению-хозяину *V. sativa*. В настоящее время коммерческие штаммы ризобий для *V. cracca* не описаны, поэтому высокоактивный штамм *Rhizobium* sp. 20-1/1 можно рекомендовать в качестве положительного контроля при постановках микровегетационных и вегетационных опытов.

После инокуляции *Rhizobium* sp. 20-1/1 культурных *V. sativa*, *Trifolium repens* L. и *M. sativa* L. клубеньки были неэффективными, тогда как на корнях дикорастущих бобовых *O. adamsiana* и *A. frigidus* клубеньков выявлено не было (27, 28). Следовательно, штамм *Rhizobium* sp. 20-1/1 показал себя как высокоэффективный микросимбионт только во взаимодействии с *V. cracca*, что свидетельствует о его узкой специфичности в отношении растения-хозяина. Известно, что сужение хозяйской специфичности характерно для поздних этапов эволюции микросимбионтов и тесно связано с повышением их N₂-фиксирующей активности (30), что хорошо согласуется с результатами настоящей работы.

В предыдущем исследовании у штамма *R. beringeri* P8/5-2 мы обнаружили основные *nod*-гены клубенькообразования (*nodA* и *nodC*) (17), а также выявили способность формировать клубеньки на корнях *V. cracca*, *L. pratensis* и *T. repens* в условиях микровегетационного опыта (данные не опубликованы), однако способность к азотфиксации не изучалась. В настоящем исследовании в условиях вегетационного опыта *R. beringeri* P8/5-2 формировал эффективный симбиоз с кормовыми бобовыми *V. sativa* и *V. cracca*, тогда как на дикорастущих арктических видах *A. frigidus*, *O. adamsiana* и *H. arcticum* клубеньков выявлено не было. Большая часть сформировавшихся клубеньков отличалась продолговатой формой и розоватым оттенком, свидетельствующим об их азотфиксирующей активности.

После инокуляции культурных бобовых *V. sativa* и *V. cracca* штаммом *R. beringeri* P8/5-2 наблюдались достоверно более низкие ($p < 0,05$) значения большинства симбиотических параметров (число клубеньков, азотфиксирующая активность и общая биомасса) по сравнению соответственно с *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM0626 и *Rhizobium* sp. 20-1/1. В то же время, несмотря на отсутствие способности *R. beringeri* P8/5-2 формировать клубеньки на дикорастущих растениях *A. frigidus*, *H. arcticum* и *O. adamsiana*,

показатели массы побегов, корней и общей сырой биомассы были достоверно выше ($p < 0,05$) в сравнении с отрицательным контролем, что, вероятно, связано со способностью штамма продуцировать фитогормоны, влияющие на рост и развитие растений. Известно, что клубеньковые бактерии, в частности представители рода *Rhizobium*, могут выступать в качестве ассоциативных микросимбионтов для многих экономически ценных небобовых культур, выделяя ростостимулирующие и фунгистатические вещества, что приводит к улучшению продуктивности сельскохозяйственных культур (31, 32).

Штамм *M. norvegicum* 20/1-4 был ранее выделен нами из растений *H. arcticum*, произрастающих в дельте р. Лены в арктической зоне Якутии (25). В настоящей работе *M. norvegicum* 20/1-4 формировал эффективный симбиоз с *H. arcticum*, *O. adamsiana* и *A. frigidus* в условиях вегетационного опыта, тогда как ранее была показана его способность формировать активные клубеньки на *O. adamsiana* и неэффективные клубеньки на *A. frigidus* в условиях МВО (28). Присутствие азотфиксирующей активности после инокуляции *A. frigidus* штаммом *M. norvegicum* 20/1-4 в условиях открытого опыта на песке в сравнении с результатом МВО на вермикулите может отражать наличие в первом случае более благоприятных условий для формирования эффективного бобово-ризобияльного симбиоза арктических растений с ризобиями.

Штаммы *Mesorhizobium* sp. 9-4/1 и *Mesorhizobium* sp. 25-2/1 были выделены из клубеньков *O. taimyrensis* и *A. frigidus*, соответственно, произрастающих в арктической зоне Якутии (28). Показано, что штаммы формировали эффективный симбиоз с арктическими бобовыми *O. adamsiana* и *A. frigidus* и были не способны образовывать клубеньки на кормовом бобовом *T. repens* в условиях стерильного МВО (28).

В настоящей работе штамм *Mesorhizobium* sp. 9-4/1 формировал азотфиксирующий симбиоз с *A. frigidus* и *O. adamsiana*, что в большинстве случаев приводило к достоверно более высоким ($p < 0,05$) значениям симбиотических параметров в сравнении с остальными вариантами инокуляции (см. табл. 2). Так, прибавка общей массы растений *A. frigidus* составила 37 %, тогда как *O. adamsiana* — 174 % относительно контроля без инокуляции. В случае с *H. arcticum* на корнях растений образовывались неэффективные клубеньки, что, однако, приводило к приросту общей сырой биомассы на 72 % в сравнении с отрицательным контролем.

Штамм *Mesorhizobium* sp. 25-2/1 формировал эффективный симбиоз с *H. arcticum*, *O. adamsiana* и *A. frigidus* в условиях вегетационного опыта, однако только в двух последних вариантах наблюдались достоверно более высокие ($p < 0,05$) значения общей сырой массы растений по сравнению с отрицательным контролем.

В работах других авторов была показана способность арктических штаммов, выделенных из клубеньков бобовых *Astragalus* и *Oxytropis*, эффективно нодулировать кормовое бобовое эспарцет виколистный (*Onobrychis viciifolia* Scop.). Выявлено, что арктические ризобии эффективнее коммерческих штаммов в условиях низкотемпературных лабораторных и полевых опытов (33, 34). Решающую роль в иницировании симбиоза при низких температурах может играть АТФаза, транспортирующая β -глюкан, который участвует в прикреплении бактериальных клеток к корням растений. Способность адаптироваться к экстремально низким температурам также может быть связана с повышенным уровнем синтеза белков холодового шока у арктических ризобий (35, 36).

Таким образом, в вегетационном опыте по изучению кросс-нодуля-

ции с участием кормовых бобовых *Vicia sativa* и *V. cracca* клубеньки формировались в обоих вариантах инокуляции штаммами *Rhizobium* sp. 20-1/1 и *R. beringeri* P8/5-2. Однако на *V. sativa* штамм *Rhizobium* sp. 20-1/1 формировал неэффективные клубеньки, тогда как в варианте инокуляции растения-хозяина *V. cracca* симбиоз был эффективным, показав более высокие значения общей биомассы (прибавка составила 39 %), числа клубеньков и азотфиксирующей активности по сравнению с коммерческим штаммом *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM0626. В отношении местных арктических видов *Hedysarum arcticum*, *Oxytropis adamsiana* и *Astragalus frigidus* более активными были штаммы, выделенные из тех же местных видов бобовых. Наибольший положительный эффект наблюдался после инокуляции штаммом *Mesorhizobium* sp. 9-4/1, который формировал активные клубеньки на *A. frigidus* и *O. adamsiana*. Так, прибавка общей массы растений *A. frigidus* составила от 13 до 37 %, *O. adamsiana* — от 32 до 174 %, *H. arcticum* — от 48 до 72 % в сравнении с остальными вариантами инокуляции. Следовательно, арктические штаммы *Rhizobium* sp. 20-1/1 и *Mesorhizobium* sp. 9-4/1 перспективны для дальнейших испытаний в условиях полевых опытов с целью создания на их основе высокоэффективных микробных препаратов для использования в северных регионах России при возделывании кормового бобового растения *V. cracca* и дикорастущих пастбищных бобовых. Штамм *R. beringeri* P8/5-2 не формировал клубеньков на *H. arcticum*, *A. frigidus* и *O. adamsiana*, однако оказывал положительный эффект на массу побегов и корней, не приводя к статистически значимому увеличению общей массы растений в сравнении с большинством вариантов инокуляции. Для изучения механизма такого эффекта необходимо проведение полногеномного секвенирования *R. beringeri* P8/5-2 с последующим поиском и изучением функциональных особенностей рост-стимулирующих генов, отвечающих за синтез фитогормонов (ауксинов, гиббереллинов, цитокининов). Последующее изучение симбиотических взаимоотношений арктических ризобий с кормовыми сельскохозяйственными и дикорастущими бобовыми в условиях вегетационных и микровегетационных опытов будет способствовать поиску наиболее перспективных растительно-ризобийных систем, адаптированных к агроэкологическим условиям Севера. Генетический материал описанных ризобий послужит ценным ресурсом при создании эффективных микробных препаратов, перспективных для развития экологически устойчивого сельского хозяйства на бедных мерзлотных почвах Арктики.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Барашков А.Е. Особенности сельского хозяйства в Арктической зоне. *Интерактивная наука*, 2023, 7(83): 49-51.
2. Unc A., Altdorff D., Abakumov E., Adl S., Baldursson S., Bechtold M., Cattani D., Firbank L., Grand S., Gudjonsdottir M., Kallenbach C., Kedir A., Li P., McKenzie D., Misra D., Naganano H., Neher D., Niemi J., Oelbermann M., Lehmann J., Parsons D., Quideau S., Sharkhuu A., Smreczak B., Sorvali J., Vallotton J., Whalen J., Young E., Zhang 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).
3. Caudry-Reznick S., Prevost D., Schulman H.M. Some properties of arctic rhizobia. *Arch. Microbiol.*, 1986, 146: 12-18 (doi: 10.1007/BF00690151).
 4. Margesin R., Miteva V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in Microbiology*, 2011, 162(3): 346-361 (doi: 10.1016/j.resmic.2010.12.004).
 5. Теличко О.Н., Мохань О.В. О селекции вики яровой. *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*, 2017, 7(153): 44-48.
 6. Неустров А.Н., Емельянова А.Г. Агроклиматический потенциал Центральной Якутии для возделывания вики яровой. *Природные ресурсы Арктики и Субарктики*, 2013, 2(70): 116-119.
 7. Wasowicz P., Sennikov A., Westergaard K., Spellman K., Carlson M., Gillespie L., Saarela J., Seefeldt S., Bennett B., Bay C., Ickert-Bond S., Vare H. Non-native vascular flora of the Arctic: taxonomic richness, distribution and pathways. *Ambio*, 2019, 49: 693-703 (doi: 10.1007/s13280-019-01296-6).
 8. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Том 1. Сорта растений (официальное издание). М., 2022.
 9. Кормовые растения сенокосов и пастбищ СССР. Т. 2. Двудольные (Хлорантовые – Бобовые) /Под ред. И.В. Ларина. Л., 1951.
 10. Мальшев Л.И. Разнообразие рода Остролодка (*Oxytropis*) в Азиатской России. *Turczaninowia*, 2008, 11(3): 5-141.
 11. Павлова П.А., Егорова П.С. Интродукция травянистых многолетников природной флоры в Якутском ботаническом саду. *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*, 2011, 7(81): 41-43.
 12. Арчегова И.Б., Котелина Н.С., Грунина Л.К., Романов Г.Г., Турубанова Л.П., Братенкова Е.С. Экологические основы управления продуктивностью агрофитоценозов восточноевропейской тундры. Л., 1991.
 13. 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).
 14. Chen Y.X., Zou L., Penttinen P., Chen Q., Li Q.Q., Wang C.Q., Xu K.W. Faba bean (*Vicia faba* L) nodulating rhizobia in panxi, china, are diverse at species, plant growth promoting ability, and symbiosis related gene levels. *Front Microbiol.*, 2018, 20(9): 1338 (doi: 10.3389/fmicb.2018.01338).
 15. Lei X., Wang E.T., Chen W.F., Sui X.H., Chen W.X. Diverse bacteria isolated from root nodules of wild *Vicia* species grown in temperate region of China. *Arch. Microbiol.*, 2008, 190(6): 657-671 (doi: 10.1007/s00203-008-0418-y).
 16. Zhang J., Li S., Wang N., Yang T., Brunel B., Andrews M., Zong X., Wang E. *Rhizobium sphaerae* is the dominant rhizobial symbiont of *Vicia faba* L. in North China. *Systematic and Applied Microbiology*, 2022, 45(1): 126291 (doi: 10.1016/j.syapm.2021.126291).
 17. 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).
 18. 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).
 19. Ezzakkioui F., El Mourabit N., Chahboune R., Castellano-Hinojosa A., Bedmar E.J., Barrijal S. Phenotypic and genetic characterization of rhizobia isolated from *Hedysarum flexuosum* in Northwest region of Morocco. *J. Basic Microbiol.*, 2015, 55(7): 830-837 (doi: 10.1002/jobm.201400790).
 20. 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).
 21. Wdowiak S., Malek W. Numerical analysis of *Astragalus cicer* microsymbionts. *Current Microbiology*, 2000, 41: 142-148 (doi: 10.1007/s002840010108).
 22. 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).
 23. Wei G.H., Zhang Z.X., Chen C., Chen W.M., Ju W.T. Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the legume genera *Astragalus*, *Lespedeza* and *Hedysarum* in northwestern China. *Microbiological Research*, 2008, 163(6): 651-662 (doi: 10.1016/j.micres.2006.09.005).
 24. Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A., Squartini A. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, 27(4): 462-468 (doi: 10.1078/0723202041438527).

25. 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).
26. Тюрин Ю.С., Степанова Г.В. К вопросу о методике селекции вики посевной в Центральном районе Нечерноземной зоны. *Зернобобовые и крупяные культуры*, 2020, 4(36): 60-70.
27. Карлов Д.С., Гуро П.В., Сазанова А.Л. И.Г. Кузнецова, Н.Ю. Тихомирова, Лашинский Н.Н., Павлов И.С., Белимов А.А., Сафронова В.И. Генетическое разнообразие и симбиотическая эффективность микросимбионтов чины болотной (*Lathyrus palustris* L.) и горошка мышиного (*Vicia cracca* L.), произрастающих в Арктической Якутии. *Сельскохозяйственная биология*, 2023, 58(3): 403-415 (doi: 10.15389/agrobiol.2023.3.403rus).
28. Кузнецова И.Г., Карлов Д.С., Гуро П.В., А.Л. Сазанова, Тихомирова Н.Ю., Лашинский Н.Н., Белимов А.А., Сафронова В.И. 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. *Сельскохозяйственная биология*, 2024, 59(5): 927-942 (doi: 10.15389/agrobiol.2024.5.927rus).
29. 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).
30. Проворов Н., Андронов Е. Эволюция клубеньковых бактерий: реконструкция процессов видообразования, обусловленных перестройками генома в системе симбиоза. *Микробиология*, 2016, 85(2): 115-125 (doi: 10.7868/S0026365616020166).
31. Хакимова Л.Р., Сербаяева Э.Р., Лавина А.М., Вершинина З.Р., Баймиев А.Х. Ростостимулирующая активность клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum*, выделенных из бобовых растений Южного Урала. *Вестник Оренбургского государственного университета*, 2017, 9(209): 96-99.
32. Yanni Y., Rizk R., Abd F., Squartini A., Corich V., Giacomini A., Bruijn F., Rademaker J., Maya-Flores J., Ostrom P., Vega-Hernandez M., Hollingsworth R., Martinez-Molina E., Mateos P., Velazquez E., Wopereis J., Triplett E., MU G., Anarna J., Dazzo F. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. *Australian Journal of Plant Physiology*, 2001, 28: 845-870 (doi: 10.1071/PP01069).
33. 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.
34. 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).
35. 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).
36. Ghobakhlou AF., Johnston A., Harris L. Antoun H., Laberge S. Microarray transcriptional profiling of Arctic *Mesorhizobium* strain N33 at low temperature provides insights into cold adaption strategies. *BMC Genomics*, 2015, 16: 383 (doi: 10.1186/s12864-015-1611-4).

ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: ig.kuznetsova@arriam.ru ✉, guro.pv@arriam.ru,
al.sazanova@arriam.ru, sekste_edgar@mail.ru, os.yuzikhin@arriam.ru,
ny.tikhomirova@arriam.ru, belimov@arriam.ru, vi.safronova@arriam.ru,
ds.karlov@arriam.ru

Поступила в редакцию
25 февраля 2025 года
Принята к публикации
24 апреля 2025 года

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2025, V. 60, № 5, pp. 898-910

SYMBIOTIC EFFICIENCY OF ARCTIC RHIZOBIA STRAINS ON *Vicia* L., *Hedysarum* L., *Astragalus* L. AND *Oxytropis* DC. IN A VEGETATION EXPERIMENT

I.G. Kuznetsova[✉], P.V. Guro, A.L. Sazanova, E.A. Sekste, O.S. Yuzikhin,
N.Yu. Tikhomirova, A.A. Belimov, V.I. Safronova, D.S. Karlov

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail ig.kuznetsova@arriam.ru (✉ corresponding author), guro.pv@arriam.ru, al.sazanova@arriam.ru, sekste_edgar@mail.ru, os.yuzikhin@arriam.ru, ny.tikhomirova@arriam.ru, belimov@arriam.ru, vi.safronova@arriam.ru, ds.karlov@arriam.ru

ORCID:

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

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

Sazanova A.L. orcid.org/0000-0002-4808-320X

Sekste E.A. orcid.org/0000-0002-9753-8303

Yuzikhin O.S. orcid.org/0000-0002-1818-9230

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

We express our gratitude to the leadership and coordinators of the expedition «Lena 2021» for organizing and conducting the expedition to the Lena River Delta. We also sincerely thank Sergei Aleksandrovich Pravkin (AARI) for his assistance in collecting and transporting legume seeds. We also thank the staff of Research Station Samoillovsky Island and Fyodor Vissanionovich Selyakhov for providing transportation.

This work was conducted using equipment from the Genomic Technologies, Proteomics, and Cell Biology' Center for Collective Use at the All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology.

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

Final revision received February 25, 2025

doi: 10.15389/agrobiol.2025.5.898eng

Accepted April 24, 2025

Abstract

Plant-microbe relationships, and in particular the legume-rhizobia symbiosis, play a key role in the development of agriculture. This role is of particular importance for the development of sustainable agriculture in the Arctic regions of Russia under extreme soil and climatic conditions. The study of the taxonomic diversity of Arctic rhizobia and their symbiotic activity with different legume species allows us to determine the host specificity of strains and to identify the most effective nitrogen fixers adapted to northern conditions. In this work, for the first time, under the conditions of pot experiments, the symbiotic efficiency of the arctic strains *Rhizobium beringeri* P8/5-2, *Rhizobium* sp. 20-1/1, *Mesorhizobium norvegicum* 20/1-4 and *Mesorhizobium* sp. 9-4/1 and 25-2/1 on the nodule forage plants *Vicia sativa* and *V. cracca*, as well as on the wild legumes *Hedysarum arcticum*, *Astragalus frigidus* and *Oxytropis adamsiana* is demonstrated. The aim of the work was to investigate the ability of arctic rhizobial strains *Rhizobium* and *Mesorhizobium* of the order *Hyphomicrobiales* to form nitrogen-fixing symbioses with forage plants (*V. sativa* and *V. cracca*) and wild Arctic legumes *H. arcticum*, *A. frigidus* and *O. adamsiana* under the conditions of a pot experiment on cross-nodulation. The work was carried out in FSBSI ARRIAM in 2024. Seeds of wild populations of the legumes *V. cracca*, *H. arcticum*, *O. adamsiana* and *A. frigidus* were collected during a Russian-German expedition to the Lena River Delta (Arctic zone of the Republic of Sakha (Yakutia)) in 2021. Seeds of fodder *V. sativa* Priobskaya 25 were purchased from Aelita agricultural company (RF). Arctic strains *R. beringeri* strains P8/5-2 (RCAM06326), *Rhizobium* sp. 20-1/1 (RCAM05664), *M. norvegicum* 20/1-4 (RCAM05519), *Mesorhizobium* sp. 9-4/1 (RCAM06350) and 25-2/1 (RCAM06353) were provided by the Network Bioresource Collection in the Field of Genetic Technologies for Agriculture (FSBSI ARRIAM, St. Petersburg). They were isolated from nodules of the arctic legumes *Lathyrus pratensis*, *V. cracca*, *H. arcticum*, *A. frigidus*, and *O. taimyrensis*. *V. sativa* and *V. cracca* plants were grown in 2-liter plastic containers containing 2 kg of sterile sand. *H. arcticum*, *O. adamsiana*, and *A. frigidus* plants were grown in 200-ml plastic beakers containing 300 g of sterile sand. Containers with 7-8 seedlings and beakers with 3 seedlings were inoculated with suspensions of individual strains at a rate of 10^6 cells per vessel. The commercial strain *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM0626 served as a positive control for *Vicia*. Uninoculated plants were used as a negative control. Plants were grown in a climate chamber MLR-352H (PHCbi, Japan). After cultivation, the fresh biomass of the shoots and roots was weighed, and the number of formed nodules was counted. The nitrogen-fixing activity of the nodules was determined by the acetylene method using a GC-2014 gas chromatograph (Shimadzu, Japan). The ability of the *R. beringeri* P8/5-2 strain to form an effective symbiosis with the forage legumes *V. sativa* and *V. cracca* was demonstrated. After inoculation with the wild arctic species *A. frigidus*, *O. adamsiana*, and *H. arcticum*, despite the absence of nodules, this strain resulted in significantly higher total fresh mass values of plants compared to the negative control. The *M. norvegicum* strain 20/1-4 formed an effective symbiosis with *H. arcticum*, *O. adamsiana*, and *A. frigidus*, but after inoculation of these legume species with the strain *Mesorhizobium* sp., the symbiosis was most effective. Thus, the increase in the total plant weight of *A. frigidus* ranged from 13 to 37 %, *O. adamsiana* from 32 to 174 %, while *H. arcticum* from 48 to 72 % compared to the other variants. When the host plant *V. cracca* was inoculated with the *Rhizobium* sp. strain, the symbiosis was effective, showing higher values of total biomass (the increase was 39 %), the number of nodules, and nitrogen-fixing activity compared to the commercial strain *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM0626. Thus, the Arctic strains *Rhizobium* sp. 20-1/1 and *Mesorhizobium* sp. 9-4/1 are promising for further testing under field conditions to create highly effective microbial preparations for use in the northern regions of Russia in the cultivation of the forage legume *V. cracca* and wild pasture legumes of the genera *Hedysarum*, *Oxytropis* and *Astragalus* as components of highly productive perennial pasture and hay sown meadows.

Keywords: Arctic region, *Vicia*, *Astragalus*, *Hedysarum*, *Oxytropis*, legume-rhizobium symbiosis, nitrogen-fixing nodule bacteria.