СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2023, том 58, № 1, с. 87-99

Симбиогенетика

УДК 631.52:581.557:575 doi: 10.15389/agrobiology.2023.1.87rus

БИОРАЗНООБРАЗИЕ СИМБИОЗОВ, ОБРАЗУЕМЫХ КЛУБЕНЬКОВЫМИ БАКТЕРИЯМИ *Rhizobium leguminosarum* С БОБОВЫМИ РАСТЕНИЯМИ ГАЛЕГОИДНОГО КОМПЛЕКСА*

О.П. ОНИЩУК[1], О.Н. КУРЧАК[1], А.К. КИМЕКЛИС[1], Т.С. АКСЕНОВА[1], Е.Е. АНДРОНОВ[1, 2], Н.А. ПРОВОРОВ[1] ✉

Клубеньковые бактерии вида *Rhizobium leguminosarum* разделяют на два биовара (bv.), которые образуют N_2-фиксирующие симбиозы с бобовыми растениями галегоидного комплекса, относящимися к трибам *Fabeae* (роды *Lathyrus*, *Lens*, *Pisum*, *Vavilovia*, *Vicia*, симбионт — *R. leguminosarum* bv. *viciae*) и *Trifolieae* (род *Trifolium*, симбионт — *R. leguminosarum* bv. *trifolii*) (J. Sprent с соавт., 2017). Ранее считалось, что перекрестная инокуляция между этими биоварами отсутствует или происходит редко, а сведения о контроле хозяйской специфичности *R. leguminosarum* были ограничены взаимодействием между линиями гороха (*P. sativum*), имеющими разные аллели гена *Sym2*, и штаммами bv. *viciae*, различающимися по наличию гена *nod*X (T.A. Lie, 1978). В настоящей работе впервые показано, что при переходе штаммов bv. *viciae* к симбиозу с эволюционно молодыми представителями трибы *Fabeae* (переход от A- к D-группе) происходит утрата бактериями способности формировать симбиоз с гетерологичным хозяином (*Trifolium*). Целью нашей работы был анализ изменчивости штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae* анцестральной (A) и эволюционно продвинутой (D) геномных групп по хозяйской специфичности и N_2-фиксирующей активности, направленный на функциональную характеристику анцестральных элементов генома, которые были выявлены ранее при сравнительно-генетическом анализе штаммов, выделенных из различающихся по филогенетическому положению представителей трибы *Fabeae*. В соответствии с ранее предложенной методикой генотипирования штаммы относили к группе A в том случае, если они содержали гены *nod*X и *fix*W, не содержали хромосомной копии оперона *fix*NOPQ, а ген *nod*T находился за пределами *nod*-кластера. При отсутствии хотя бы одного из этих признаков штаммы относили к группе D (E. Chirak с соавт., 2019). Штаммы группы A выделены из реликтового бобового *Vavilovia formosa*, а также из дикорастущих афганских линий *P. sativum*, штаммы группы D — из культурных европейских линий *P. sativum*, а также из *Vicia sativa* и *V. alpestris*. В опытах по анализу перекрестной инокуляции двух биоваров вида *R. leguminosarum* использовали штаммы bv. *viciae*, выделенные из клубеньков *Vavilovia formosa, Vicia sativa, V. subrotunda*, европейских линий *Pisum sativum*, афганских линий *P. sativum*, а также штаммы bv. *trifolii* из клубеньков клевера (*Trifolium pratense, T. ambiguum, T. montanum*). При проведении микровегетационных опытов растения, инокулированные ризобиями, выращивали в гнотобиотических условиях на вермикулите. N_2-фиксирующую активность определяли с помощью ацетиленового метода, основанного на использовании C_2H_2 в качестве субстрата для нитрогеназы. На основании полученных результатов были выявлены следующие симбиотические фенотипы: Fix^+ — N_2-фиксирующие (крупные, розовые) клубеньки; Fix^- — не фиксирующие N_2 (мелкие, белые, но морфологически нормальные) клубеньки; $Fix^{+/-}$ — не фиксирующие N_2 клубеньки, сходные с Fix^+ клубеньками (крупные, розовые); Ndv^- — не фиксирующие N_2, опухолеподобные клубеньки; Nod^- — клубеньки отсутствовали. Оказалось, что 9 из 11 штаммов анцестральной группы образовали на клевере клубеньки фенотипа Fix^-, 2 штамма — клубеньки фенотипа Ndv^-. Среди 8 штаммов эволюционно продвинутой группы фенотипы Fix^- и Ndv^- выявлены соответственно у 4 и 2 штаммов, а 2 штамма не образовали на клевере клубеньков (Nod^-), что указывало на сужение хозяйской специфичности ризобий в процессе коэволюции bv. *viciae* с растениями-хозяевами. Среди 6 штаммов ризобий клевера 4 штамма проявили способность к инокуляции вики с образованием Fix^- клубеньков. В опытах по контролю за отсутствием контаминации ДНК выделяли из клубеньков с использованием набора NucleoSpin™ Soil («Macherey-Nagel GmbH & Co. KG», Германия), фрагмент гена *nod*A амплифицировали с использованием универсальных праймеров для биоваров *R. leguminosarum* (ndARL302_F YTDGGMATCGCHCACT/ndARL518_R RDACGAGBACRTCTTCRGT). Полученные данные показали, что в условиях стерильных микровегетационных опытов контаминация отсутствует и способность к перекрестной инокуляции проявляет большинство штаммов bv. *viciae* (образуют клубеньки на клевере) и bv. *trifolii* (образуют клубеньки на вике). Однако эта способность ограничена формированием у гетерологичных хозяев не фиксирующих N_2, в том числе аномальных по морфологии (опухолеподобных), клубеньков. Изучение симбиозов, образуемых 9 видами растений трибы *Fabeae* (*Pisum sativum, Vicia sativa, V. villosa, V. alpestris, Vavilovia formosa, Lens culinaris, L. nigricans, Lathyrus pratensis, L. sylvestris*) с 6 штаммами *R. leguminosarum* bv. *viciae*, показало высокую специфичность образования N_2-фиксирующего симбиоза, которая зависит главным образом от происхождения бактерий. Штаммы, выделенные из одного и того

* Работа поддержана грантом РНФ 19-16-00081П.

же растения-хозяина (*V. formosa* или *P. sativum*), оказались более сходными по хозяйской специфичности, чем штаммы из разных хозяев. На основе полученных данных предложена гипотетическая схема эволюции вида *R. leguminosarum*, в соответствии с которой дивергентная эволюция bv. *viciae* определяется процессами видообразования, происходящего в трибе *Fabeae*; наиболее близким к общему предку вида *R. leguminosarum* является bv. *trifolii*, сохранивший примитивные черты организации генома и, возможно, возникший посредством изменения хозяйской специфичности у анцестральных штаммов bv. *viciae*. Их близкими родичами могут считаться штаммы bv. *viciae*, выделенные из вавиловии, которые в большей (по сравнению со штаммами из гороха и вики) степени проявляют способность формировать на клевере морфологически нормальные клубеньки. Полученные данные показывают возможность конструирования штаммов ризобий, обладающих повышенной симбиотической активностью, посредством редактирования анцестральных компонентов их геномов.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, бобовые растения, симбиотическая N_2-фиксация, хозяйская специфичность, биоразнообразие, *Rhizobium leguminosarum*, геномные группы, эволюция симбиоза.

Симбиозы бобовых растений с N_2-фиксирующими клубеньковыми бактериями (ризобиями) весьма разнообразны по структурно-функциональной организации и специфичности взаимодействия партнеров (1). Наиболее изучены симбиозы, образуемые бактериями сем. *Rhizobiaceae* (роды *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Neorhizobium*) с растениями галегоидного комплекса, включающего трибы *Fabeae*, *Galegae* и *Trifolieae*. Ризобии инфицируют эти растения через корневые волоски, где возникают инфекционные нити — тубулярные структуры, из которых бактерии переходят в состав внутриклеточных симбиосом и преобразуются в необратимо дифференцированные N_2-фиксирующие бактероиды (2).

Для симбиозов, формируемых галегоидными бобовыми, характерна высокая специфичность взаимодействия партнеров, которая выражается в образовании обособленных групп перекрестной инокуляции (ГПИ) (3). Например, вид *Rhizobium leguminosarum* подразделяют на два биовара, формирующих различные ГПИ, хозяевами которых служат растения, входящие в IRLC-группу галегоидного комплекса (характеризуется отсутствием в пластидной ДНК инвертированного повтора размером 25 т.п.н., выявленного у большинства галегоидных бобовых). Симбионтов растений трибы *Fabeae* (роды *Lathyrus*, *Lens*, *Pisum*, *Vavilovia*, *Vicia*) относят к биовару (bv.) *viciae*, а симбионтов рода *Trifolium* (триба *Trifolieae*) — к bv. *trifolii*. Анализ генетического разнообразия штаммов *R. leguminosarum* показал, что биовары *viciae* и *trifolii* различаются по структуре специализированных для симбиоза (*sym*) генов, входящих в акцессорную часть генома, значительно сильнее, чем по структуре генов его коровой части, определяющих функции домашнего хозяйства (4, 5).

Ранее мы показали (6), что штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae* разделяются на две геномные группы — анцестральную (A) и эволюционно продвинутую (D). Для штаммов группы A, выделенных из клубеньков *Vavilovia formosa*, предполагаемого ближайшего родича общего предка трибы *Fabeae* (7), и дикорастущих (афганских) форм гороха посевного *P. sativum* характерно следующее: наличие гена *nod*X, контролирующего широкую хозяйскую специфичность (8), и гена *fix*W, который кодирует фермент, разрушающий дисульфидные связи в белках (9); отсутствие хромосомной копии оперона *fix*NOPQ, кодирующего цитохромоксидазу с высоким сродством к O_2 (10); значительный (более 90 т.п.н.) размер плазмидного кластера *sym*-генов; расположение гена *nod*T за пределами этого кластера. У штаммов группы D отсутствуют гены *nod*X и *fix*W, выявляется хромосомная копия оперона *fix*NOPQ, кластер *sym*-генов имеет размер менее 60 т.п.н., а *nod*T включен в кластер *nod*-генов. Предполагается, что переход от A- к D-группе, который произошел в результате коэволюции ризобий и их хозяев, сопровождался повышением приспособленности бактерий к существова-

нию в системах растение—почва, связанной с активностью симбиоза (11).

В настоящей работе впервые показано, что при переходе штаммов bv. *viciae* к симбиозу с эволюционно молодыми представителями трибы *Fabeae* (переход от A- к D-группе) происходит утрата бактериями способности формировать симбиоз с гетерологичным хозяином (*Trifolium*). В условиях стерильных микровегетационных опытов способность к перекрестной инокуляции проявляет большинство штаммов bv. *viciae* (образуют клубеньки на клевере) и bv. *trifolii* (образуют клубеньки на вике). Однако эта способность ограничена формированием у гетерологичных хозяев не фиксирующих N_2, в том числе аномальных по морфологии (опухолеподобных), клубеньков. Предложена гипотетическая схема эволюции вида *R. leguminosarum*, в соответствии с которой дивергенция bv. *viciae* определяется возрастанием разнообразия растений трибы *Fabeae*, а наиболее близок к общему предку этого вида bv. *trifolii*, сохранивший эволюционно примитивную организацию *sym*-генов и, возможно, возникший посредством изменения хозяйской специфичности у анцестральных штаммов bv. *viciae*, ближайшими родичами которых могут считаться симбионты *V. formosa*.

Целью нашей работы был анализ изменчивости штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* анцестральной (A) и эволюционно продвинутой (D) геномных групп по хозяйской специфичности и N_2-фиксирующей активности, направленный на функциональную характеристику анцестральных элементов генома, которые были выявлены ранее при сравнительно-генетическом анализе штаммов, выделенных из различающихся по филогенетическому положению представителей трибы *Fabeae*.

Методика. В опытах использовали штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae* из коллекции Всероссийского НИИ сельскохозяйственной микробиологии, выделенные из клубеньков *Vavilovia formosa* (Steven) Fed. (Vaf10, Vaf12, Vaf13, Vaf35, Vaf25, Vaf01, Vaf46, Vaf96, Vaf108, 1B2, 1G1), *Vicia sativa* L. (Vst35-4, Vst36-3, 1-32), *V. subrotunda* (Maxim.) Czefr. (Vs35-4, Vs36-3, Vs37-3, 2S1, 3S1, 2-1k, 3Vsb, 1Vsd, L1-1, L2-1), европейских линий *Pisum sativum* L. (1079, CIAM1026, Wp1, Wp3, Wp40, Wp19, Wp24, Wp60), афганских линий *P. sativum* L. (A1, TOM), а также штаммы *R. leguminosarum* bv. *trifolii* из клубеньков клевера (*Trifolium pretense* L., *T. ambiguum* M. Bieb., *T. montanum* L.) (Tp73-4, Tr11, Tm2, Ta6, Ka1, Ka5). В качестве негативного контроля в опытах по перекрестной инокуляции использовали штаммы ризобий люцерны *Sinorhizobium meliloti* (AK57, A18) и козлятника *Neorhizobium galegae* (Gr12/7, Gr1025), не образующие клубеньков на растениях-хозяевах вида *R. leguminosarum*.

Семена *Vicia alpestris* Steven (И-0146902), *V. sativa* L. (сорт Никольская, K-36638), *V. villosa* Roth. (сорт Луговская 2, K-37019), *Lens culinaris* Medikus (сорт Пикантная, K-3051), *L. nigricans* (M.Bieb.) Godr. (ILWL37), *Lathyrus pratensis* L. (N094275), *L. sylvestris* L. (K 1959), *T. pratense* L. (сорт Суйдинец, K-34600) получены из коллекции Всероссийского НИИ растительных ресурсов им. Н.И. Вавилова, семена *P. sativum* L. (афганская линия NGB2150, европейские линии Frisson и SGE) — из коллекции Всероссийского НИИ сельскохозяйственной микробиологии, семена *V. formosa* (Steven) Fed. собраны с дикорастущих растений на Кавказе (12).

При проведении микровегетационных опытов растения, инокулированные ризобиями, выращивали в гнотобиотических условиях на вермикулите с безазотной средой Красильникова-Кореняко в пробирках объемом 60 мл (*Trifolium*, *Lathyrus*, *Vicia*) или в стеклянных цилиндрах объемом 1000 мл (*Lens*, *Pisum*, *Vavilovia*). N_2-фиксирующую активность определяли с помощью ацетиленового метода, основанного на использовании C_2H_2

в качестве субстрата для нитрогеназы (13). Корни с клубеньками помещали в герметично закрытые флаконы объемом 50 мл, в которые вводили 2,5 мл C_2H_2 (5 % объема) и инкубировали 1 ч. При этом восстановление N_2 блокируется и происходит образование C_2H_4, количество которого определяли на газовом хроматографе GC-2010 («Shimadzu», Япония). На основании результатов микровегетационных опытов были выявлены следующие симбиотические фенотипы: Fix^+ — N_2-фиксирующие (крупные, розовые) клубеньки; Fix^- — не фиксирующие N_2 (мелкие, белые, но морфологически нормальные) клубеньки; $Fix^{+/-}$ — не фиксирующие N_2 клубеньки, сходные с Fix^+ клубеньками (крупные, розовые); Ndv^- — не фиксирующие N_2, опухолеподобные клубеньки; Nod^- — клубеньки отсутствовали.

ДНК выделяли из клубеньков с использованием набора NucleoSpin™ Soil («Macherey-Nagel GmbH & Co. KG», Германия), фрагмент гена *nod*A амплифицировали в режиме 30 с при 95 °C, 30 с при 50 °C, 30 с при 72 °C (35 циклов) с использованием универсальных праймеров для биоваров *R. leguminosarum* (ndARL302_F YTDGGMATCGCHCACT/ndARL518_R RDACGAGBACRTCTTCRGT). Секвенирование ампликонных библиотек проводили по технологии Illumina на приборе Illumina MiSeq («Illumina, Inc.», США) с использованием набора реактивов MiSeq® ReagentKit v3 (600 cycle) с двусторонним чтением (2×300 н.). Обработку полученных последовательностей осуществляли с помощью ПО Illumina.

В соответствии с ранее предложенной методикой генотипирования (6) штаммы относили к анцестральной геномной группе A в том случае, если они содержали гены *nod*X и *fix*W, не содержали хромосомной копии оперона *fix*NOPQ, а ген *nod*T находился за пределами *nod*-кластера. При отсутствии хотя бы одного из этих признаков штаммы относили к эволюционно продвинутой группе D.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью дисперсионного анализа и *t*-критерия Стьюдента, значения которого (t_{St}) использовали для оценки вероятности нулевой гипотезы (P_0) об отсутствии различий между изучаемыми выборками штаммов (14). Штаммы считали N_2-фиксирующими (Fix^+) если количество C_2H_4 в опытной пробе было достоверно выше, чем в контроле без инокуляции. Для проведения кластерного анализа симбиотическим фенотипам придали численные значения (0 — Nod^-, 1 — Fix^-, 2 — $Fix^{+/-}$, 3 — Fix^+), которые использовали для вычисления евклидовых расстояний между фенотипами штаммов, построения денрограммы по методу UPGM и статистической поддержки кластеров bootstrap с использованием программы PAST (15).

Результаты. На первом этапе работы мы провели анализ перекрестной инокуляции биоваров *viciae* и *trifolii* с их растениями-хозяевами (триба *Fabeae* и род *Trifolium*). Результаты микровегетационных опытов показали (табл. 1, рис. 1), что среди 33 испытанных штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae*, выделенных из гороха, вики и вавиловии, 28 штаммов формировали на клевере луговом (*T. pratense*) не фиксирующие N_2 клубеньки (23 штамма образовали морфологически нормальные клубеньки фенотипа Fix^-, 5 штаммов — опухолеподобные клубеньки фенотипа Ndv^-), а 5 штаммов не образовали клубеньков (фенотип Nod^-). Важно отметить, что Fix^- клубеньки на клевере формировали 91,6 % штаммов, выделенных из вавиловии, и только 57,1 % штаммов из вики и гороха (t_{St} = 2,57; P_0 < 0,05). Кроме того, на растениях вики клубеньки Fix^+ образовывали лишь 41,7 % штаммов, выделенных из вавиловии, и 100 % штаммов из вики и гороха (t_{St} = 2,93; P_0 < 0,05), что указывало на специализацию симбионтов вавиловии к своему хозяину.

1. Перекрестная инокуляция бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* и *R. leguminosarum* bv. *trifolii* с растениями-хозяевами в зависимости от происхождения и геномной организации штаммов

Растения, из которых выделены штаммы	Число изученных штаммов (число штаммов, имеющих ген *nod*X)	Соотношение геномных групп A:D	Симбиотические фенотипы штаммов на растениях	
			Vicia villosa Roth.	*Trifolium pratense* L.
		R. leguminosarum bv. *viciae*		
Vavilovia formosa (Steven) Fed.	12 (12)	7:0	5 Fix^+, 7 Fix^-	11 Fix^-, 1 Nod^-
Vicia sativa L.	3 (3)	0:3	3 Fix^+	3 Fix^-
V. subrotunda (Maxim.) Czefr.	10 (8)	2:1	10 Fix^+	6 Fix^-, 2 Ndv^-, 2 Nod^-
Pisum sativum L. (европейские линии)	6 (0)	0:4	6 Fix^+	3 Fix^-, 1 Ndv^-, 2 Nod^-
P. sativum L. (афганские линии)	2 (2)	2:0	2 Fix^+	2 Ndv^-
		R. leguminosarum bv. *trifolii*		
Trifolium spp.	6 (6)	Не определяли	4 Fix^-, 2 Nod^-	6 Fix^+

Примечание. Для bv. *viciae* указано соотношение штаммов, относящихся к анцестральной (A) и эволюционно продвинутой (D) геномным группам. Fix^+ — N_2-фиксирующие (крупные, розовые) клубеньки, Fix^- — не фиксирующие N_2 (мелкие, белые, но морфологически нормальные) клубеньки, Ndv^- — не фиксирующие N_2, опухолеподобные клубеньки, Nod^- — клубеньки отсутствовали.

Рис. 1. Фенотипы клубеньков, образованных на корнях *Trifolium pratense* L. различными штаммами *Rhizobium leguminosarum*: а — Vaf12 bv. *viciae* (опухолеподобные, не фиксирующие N_2 клубеньки, Ndv^-), б — Vaf108 bv. *viciae* (морфологически нормальные, не фиксирующие N_2 клубеньки, Fix^-), в — Ta6 bv. *trifolii* (N_2-фиксирующие клубеньки, Fix^+).

Чтобы сопоставить фенотипическое варьирование изученных штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae* с их геномной организацией, мы, используя предложенную ранее (6) методику, выделили среди них анцестральную (A) и эволюционно продвинутую (D) группы (см. табл. 1). Оказалось, что 9 из 11 штаммов группы A проявляли на клевере фенотип Fix^-, 2 штамма — фенотип Ndv^-. Среди 8 штаммов группы D фенотипы Fix^- и Ndv^- были выявлены соответственно у 4 и 2 штаммов, а 2 штамма не образовали на клевере клубеньков (фенотип Nod^-). Из 6 изученных нами штаммов ризобий клевера (*R. leguminosarum* bv. *trifolii*) 4 штамма проявляли на вике мохнатой (*V. villosa*) фенотип Fix^-, 2 штамма — фенотип Nod^- (см. табл. 1). При инокуляции клевера и вики симбионтами люцерны (*Sinorhizobium meliloti*) и козлятника (*Neorhizobium galegae*), как и в контролях без инокуляции, клубеньки отсутствовали.

Генотипирование показало, что способность биоваров *R. leguminosarum* формировать клубеньки на растениях из гетерологичных групп перекрестной инокуляции не связана с присутствием гена *nod*X. Действительно, фенотип Fix^- на клевере проявили как выделенные из вавиловии *nod*X-содержащие штаммы bv. *viciae*, так и лишенные этого гена штаммы из европейских линий гороха. Несмотря на контрастное варьирование штаммов bv. *trifolii* по способности формировать клубеньки на вике, все они имели ген *nod*X.

Чтобы подтвердить феномен перекрестной инокуляции между ризобиями разных биоваров, исключив контаминацию суспензий bv. *viciae*,

использованных для инокуляции клевера, «спонтанными» штаммами bv. *trifolii*, а также суспензий bv. *trifolii*, использованных для инокуляции вики, штаммами bv. *viciae*, мы выделили из образовавшихся Fix^- клубеньков тотальную ДНК, из которой были приготовлены ампликонные библиотеки по гену *nod*A, имеющему четкие различия у сопоставляемых биоваров ризобий (16). Глубокое секвенирование этих библиотек (проверено свыше 10 тыс. последовательностей гена *nod*A из Fix^- клубеньков, образованных штаммами Vaf12 и Vaf108 на клевере, а также штаммом Tr11 на вике) не выявило присутствия в них контаминантов.

На втором этапе работы штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae*, представляющие различные геномные группы, использовали для инокуляции 9 видов бобовых из всех 5 родов трибы *Fabeae*. Fix^+ клубеньки образовывались лишь в 19 из 60 генотипических комбинаций партнеров, указывая на высокую специфичность образования N_2-фиксирующего симбиоза (табл. 2). Среди 3 широко специфичных штаммов, которые образовывали Fix^+ клубеньки с 5-8 видами растений, 2 штамма (Vaf-12 и A1) представляли геномную группу A (ген *nod*X присутствует), а 1 штамм (1079) — группу D (*nod*X отсутствует). Входящие в группу A штаммы Vaf-10, Vaf-46 и Vaf-108 формировали со всеми изученными бобовыми не фиксирующие N_2 клубеньки, однако у исходного хозяина, вавиловии, они были сходны с Fix^+ клубеньками (крупный размер, розовый цвет) и выделены в отдельный фенотип ($Fix^{+/-}$). Важно отметить, что все изученные виды растений формировали Fix^+ клубеньки хотя бы с одним из испытанных штаммов ризобий. Следовательно, специфичность образования N_2-фиксирующего симбиоза более существенно зависела от штамма бактерий, чем от вида растений.

2. Специфичность взаимодействия различных штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* и растений трибы *Fabeae*

Штамм	Растения-хозяева										
	Pisum sativum		*Vicia*			*Vavilovia formosa*	*Lens*		*Lathyrus*		всего Fix^+
	афганский	европейский	*alpestris*	*sativa*	*villosa*		*culinaris*	*nigricans*	*pratensis*	*sylvestris*	
Vaf-10 (A)	Fix^-	Fix^-	Fix^-	Fix^-	Fix^-	$Fix^{+/-}$	Fix^-	Fix^-	Fix^-	Fix^-	0
Vaf-12 (A)	Fix^-	Fix^-	Fix^+	Fix^+	Fix^+	$Fix^{+/-}$	Fix^+	Fix^+	Fix^-	Fix^-	5
Vaf-46 (A)	Fix^-	Fix^-	Fix^-	Fix^-	Fix^-	Fix^-	Fix^-	Fix^-	Fix^-	Fix^-	0
Vaf-108 (A)	Fix^-	Fix^-	Fix^-	Fix^-	Fix^-	$Fix^{+/-}$	Fix^-	Fix^-	Fix^-	Fix^-	0
A1 (A)	Fix^+	Fix^+	Fix^-	Fix^+	Fix^+	Fix^+	Fix^+	Fix^+	Fix^+	Fix^-	8
1079 (D)	Nod^-	Fix^+	Nod^-	Fix^+	Fix^+	Fix^-	Fix^+	Fix^+	Fix^-	Fix^+	6
Всего Fix^+	1	2	1	3	3	1	3	3	1	1	19

Примечание. В скобках указана принадлежность штаммов к геномным группам: A — анцестральная, D — эволюционно продвинутая. Fix^+ — N_2-фиксирующие (крупные, розовые) клубеньки, Fix^- — не фиксирующие N_2 (мелкие, белые, но морфологически нормальные) клубеньки, $Fix^{+/-}$ — не фиксирующие N_2 клубеньки, сходные с Fix^+ клубеньками (крупные, розовые), Nod^- — клубеньки отсутствовали.

Для изучения связи между хозяйской специфичностью штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae* и их происхождением мы проанализировали сходство этих штаммов по симбиотическим фенотипам, проявляемым при взаимодействии с 10 формами растений (см. табл. 2). Оказалось, что при сравнении штаммов, выделенных из одного и того же вида бобовых (вавиловии или гороха), среднее число совпадений по фенотипу Fix^+ составляет 6±0,97, а среди штаммов из разных видов бобовых — лишь 2±0,68 (t_{St} = 3,39; P_0 < 0,01). Кластерный анализ полученных данных выявил фенотипическое сходство штаммов из вавиловии Vaf10, Vaf46 и Vaf108, формирующих компактный кластер с уровнем поддержки bootstrap 99 %, а также кластер с гораздо более низким уровнем поддержки (50 %), объединяющий штаммы Vaf12 из вавиловии, A1 из афганского гороха и 1079 из европейского гороха (рис. 2).

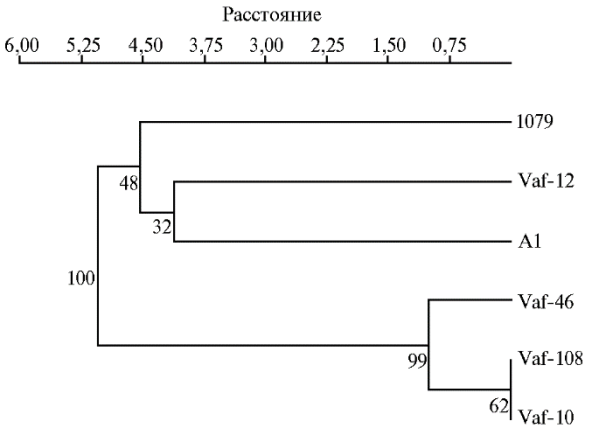

Рис. 2. Результаты кластерного анализа штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* по фенотипу, проявляемому в симбиозе с различными видами бобовых трибы *Fabeae* (на основании данных таблицы 2; указаны евклидовы расстояния и уровни поддержки кластеров bootstrap)**.**

Симбиозы, образуемые клубеньковыми бактериями (ризобиями) и бобовыми растениями — одна из наиболее разработанных моделей для генетического анализа взаимодействий прокариот и эукариот, а также для разработки методов конструирования микробно-растительных систем сельскохозяйственного назначения (17). Предложенные ранее подходы для решения этой задачи включают получение мутантов и рекомбинантов с повышенной N_2-фиксирующей активностью, симбиотической эффективностью (способностью повышать продуктивность растений-хозяев), а также способностью конкурировать с аборигенными штаммами ризобий за образование у растений клубеньков.

Показано, что повышение N_2-фиксирующей активности ризобий может быть достигнуто посредством амплификации генов, обеспечивающих образование нитрогеназного комплекса и его снабжение энергией (18). Еще более перспективным подходом оказалась инактивация негативных регуляторов симбиоза, включая гены, контролирующие конверсию получаемых от растений С-соединений в запасные питательные вещества — поли-бета-гидроксибутират (19-21) и гликоген (22), а также транспорт сахаров (23), высокую интенсивность дыхания (24) и образование поверхностных полисахаридов, защищающих бактерии от эдафических (осмотических, температурных, водных) стрессов (25).

Аналогичные подходы могут быть использованы для повышения конкурентоспособности ризобий. Они основаны на амплификации позитивных регуляторов этого признака — генов, активирующих синтез поверхностных полисахаридов (26) и пролин-дегидрогеназы (27), образование клубеньков (28), а также на инактивации негативных регуляторов конкурентоспособности, подавляющих экспрессию генов образования клубеньков (29), синтез НАДФ-зависимой дегидрогеназы (30) и образование биопленок (31).

Учитывая, что в процессе эволюции бобово-ризобиального симбиоза возрастала его экологическая эффективность (1), перспективным представляется редактирование анцестральных элементов генома ризобий, которые участвуют в контроле симбиотических свойств. Ранее для выявления этих элементов у политипического (состоящего из нескольких различающихся по хозяйской специфичности биоваров) вида *R. leguminosarum* мы использовали подход, который основан на сравнительно-генетическом анализе штаммов, выделенных из различающихся по филогенетическому положению представителей трибы *Fabeae* (11). Среди штаммов *R. legumino-*

sarum, перспективных для выявления анцестральных элементов генома, наибольший интерес представляют симбионты *Vavilovia formosa* — реликтового вида трибы *Fabeae*, который может считаться ближайшим родичем ее общего предка (7). На основании данных о распространении вавиловии в высокогорных районах Кавказа и Центральной Азии, а также об особенностях геномной организации ее симбионтов они были определены как близкие к общему предку bv. *viciae*, а возможно, и всего вида *R. leguminosarum* (5, 6).

В настоящей статье дана характеристика изменчивости штаммов *R. leguminosarum*, различающихся составом анцестральных элементов генома, по их влиянию на хозяйскую специфичность и N_2-фиксирующую активность, что позволяет оценить возможность использования этих элементов в биотехнологических программах. Мы изучали хозяйскую специфичность *R. leguminosarum* посредством анализа перекрестной инокуляции биоваров *viciae* и *trifolii*, а также взаимодействия штаммов bv. *viciae* с различными видами трибы *Fabeae*. Ранее считалось, что группы перекрестной инокуляции, образуемые биоварами *viciae* и *trifolii*, полностью обособлены друг от друга (3). Однако мы показали, что большинство штаммов bv. *viciae* образуют клубеньки на клевере, а большинство штаммов bv. *trifolii* — на вике (см. табл. 1). Хотя выявленная нами перекрестная инокуляция биоваров была ограничена образованием не фиксирующих N_2, в том числе аномальных по морфологии, клубеньков, полученные данные указывают на неполную симбиотическую дивергенцию биоваров *viciae* и *trifolii*, которая может быть связана с их недавним обособлением от общего предка, имевшего широкую хозяйскую специфичность.

Ранее на основе анализа геномного разнообразия анцестральной (A) и эволюционно продвинутой (D) групп штаммов мы предположили (11), что переход от группы A к группе D вызывает повышение адаптивного потенциала вида *R. leguminosarum*, определяемое интенсификацией транспорта Nod-фактора (связан с миграцией гена *nod*T в состав *nod*-кластера), дыхания бактерий в почве (связано с приобретением хромосомной копии оперона *fix*NOPQ) и глубокой дифференцировкой бактероидов (определяется утратой гена *fix*W).

В настоящей работе установлено, что 9 из 11 штаммов группы A образовывали на клевере не фиксирующие N_2, нормальные по морфологии клубеньки (фенотип Fix^-), а 2 штамма — опухолеподобные клубеньки, в которых, как показали результаты анализа мутантов ризобий, дефектных по синтезу липо- и экзополисахаридов (32), было нарушено проникновение бактерий в ткани корня (фенотип Ndv^-). Среди штаммов группы D встречаемость фенотипа Fix^- оказалась ниже, чем среди штаммов группы A. Эти данные указывают на то, что переход от анцестральной к эволюционно продвинутой организации генома сопровождался утратой биоваром *viciae* способности инокулировать растения клевера.

Важно отметить, что способность сопоставляемых биоваров *R. leguminosarum* формировать клубеньки на чужеродных хозяевах не связана с присутствием гена *nod*X, который ранее считали основной детерминантой хозяйской специфичности указанного вида ризобий. Этот ген, впервые выявленный у штаммов bv. *viciae* из афганских линий гороха (8), позднее был обнаружен у штаммов, выделенных из вавиловии и некоторых других представителей трибы *Fabeae* (6), а также у всех изученных штаммов bv. *trifolii* (33). Представленные данные указывают на то, что характерная для D-группы утрата гена *nod*X, по всей видимости, не была непосредственной причиной диверсификации вида *R. leguminosarum* по хозяйской специфичности, хотя *nod*X может рассматриваться как маркер этого процесса.

Мы охарактеризовали хозяйскую специфичность штаммов bv. *viciae*, которая определяется формированием N_2-фиксирующих клубеньков у 9 видов бобовых, представляющих все 5 родов трибы *Fabeae* (см. табл. 2). Эта специфичность более существенно зависит от бактерий, чем от растений, и проявляется при сравнении штаммов, выделенных из *P. sativum* и его эволюционного предшественника *V. formosa* (см. рис. 2).

Полученные данные позволили нам предложить гипотетическую схему эволюции вида *R. leguminosarum* (рис. 3), согласно которой его общий предок (протосимбионт) был способен формировать симбиоз с анцестральными представителями IRLC-группы бобовых галегоидного комплекса. Начальным этапом эволюции протосимбионта могла быть дивергенция по признаку хозяйской специфичности, которая привела к возникновению биоваров *viciae* и *trifolii*, способных к N_2-фиксирующему симбиозу с растениями лишь одной трибы — *Fabeae* или *Trifolieae*.

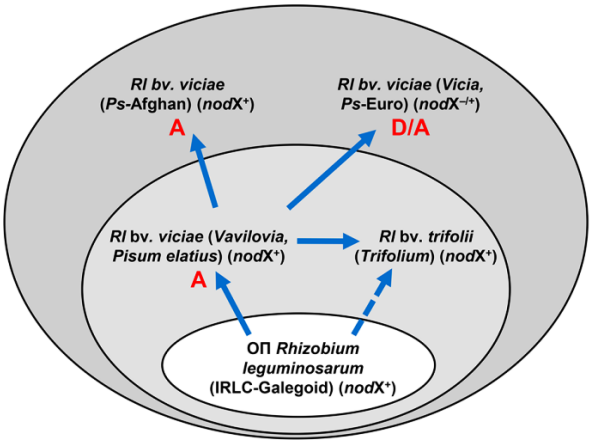

Рис. 3. Дивергентная эволюция вида *Rhizobium leguminosarum* (*Rl*), которая привела к формированию биоваров *viciae* и *trifolii*. *Vavilovia* — ближайший родич общего предка бобовых трибы *Fabeae*, хозяев *R. leguminosarum* bv. *viciae*. *Pisum elatius* Bieb. — дикорастущий вид гороха, ареал которого перекрывается со средиземноморским центром происхождения рода *Trifolium*. *Ps*-Afghan и *Ps*-Euro — дикорастущие (афганские) и культурные (европейские) линии гороха посевного (*P. sativum*). В белом овале представлен гипотетический общий предок (ОП) вида *Rhizobium leguminosarum* — симбионт общего предка IRLC-группы бобовых галегоидного комплекса; в светло-сером овале — анцестральные формы bv. *viciae* с геном *nod*X (симбионты *Vavilovia formosa* (Steven) Fed. и *P. elatius* Bieb., относящиеся к геномной группе A) и bv. *trifolii*; в темно-сером овале — эволюционно продвинутые формы bv. *viciae* (большинство симбионтов *Ps*-Euro и *Vicia* относится к геномной группе D, для которой характерна утрата гена *nod*X). Наиболее вероятные направления эволюции показаны сплошными стрелками.

При этом биовар *trifolii* мог возникнуть либо непосредственно из протосимбионта, либо посредством изменения хозяйской специфичности анцестральных штаммов bv. *viciae*. В пользу второго способа говорит то, что ареал распространения одного из дикорастущих видов гороха (*P. elatius*) перекрывается со Средиземноморским центром происхождения рода *Trifolium* (34, 35), а большинство штаммов bv. *viciae* и bv. *trifolii* проявляет способность к перекрестной инокуляции с образованием не фиксирующих N_2 клубеньков. Можно предположить, что у bv. *viciae*, который, по-видимому, эволюционировал быстрее, чем bv. *trifolii* в связи с более широкой таксономической диверсификацией соответствующих растений-хозяев, при специализации к вновь возникавшим видам бобовых способность формировать клубеньки на клевере утрачивалась либо замещалась формированием опухолеподобных структур, в которых нарушено инфицирование бактериями растительных тканей.

Полученные данные позволяют предположить, что симбиотические свойства общего предка bv. *viciae* в наибольшей степени сохраняли штаммы, выделенные из *V. formosa*, среди которых 91,6 % были способны формировать морфологически нормальные (Fix^-) клубеньки на клевере, тогда как среди штаммов из вики и гороха эту способность проявляли только 57,1 %. Кроме того, лишь 41,7 % штаммов из вавиловии проявляли на вике фенотип Fix^+, который показан для всех штаммов, выделенных из вики и гороха. Следовательно, штаммы из вавиловии, в наибольшей степени сохранившие широкую хозяйскую специфичность по отношению к разным трибам бобовых, еще не в полной мере приобрели способность к симбиозу с эволюционно молодыми представителями трибы *Fabeae*. Это подтверждает целесообразность высказанного ранее (4) предложения выделить штаммы вавиловии в отдельный симбиовар, входящий в bv. *viciae*.

Таким образом, при изучении хозяйской специфичности ризобий вида *Rhizobium leguminosarum* нами показана перекрестная инокуляция биоваров *viciae* и *trifolii*, которая приводит к образованию не фиксирующих N_2 клубеньков, имеющих либо нормальную, либо аномальную (опухолеподобную) структуру, причем во втором случае блокировано инфицирование бактериями растительных тканей. На основании полученных данных построена гипотетическая схема эволюции вида *R. leguminosarum* и впервые предложена гипотеза о возникновении биовара *trifolii*, сохранившего примитивные черты организации генома этого вида, посредством изменения хозяйской специфичности у анцестральных штаммов bv. *viciae*. Наибольшую активность перекрестной инокуляции с клевером проявляли анцестральные штаммы биовара *viciae*, выделенные из клубеньков реликтового бобового вавиловии, указывая на то, что широкая хозяйская специфичность, которая у ризобий обычно сочетается с низкой N_2-фиксирующей активностью, может быть свойством, существенно ограничивающим агрономический потенциал производственных штаммов. Учитывая, что ранее значительное число анцестральных генетических элементов было выявлено у симбионтов эволюционно продвинутых бобовых трибы *Fabeae*, актуальна задача выявления этих элементов в геномах хозяйственно ценных штаммов. Особого внимания требует присутствие у этих штаммов гена *fix*W, который препятствует полному развитию бактероидов, ограничивая их N_2-фиксирующую активность. Поскольку изменения организации *sym*-генов, которые происходили при переходе от анцестральной геномной группы A к эволюционно продвинутой группе D, сопряжены с повышением симбиотической активности бактерий, очевидно, что внесение аналогичных изменений в геномы производственных штаммов представляют большой биотехнологический интерес. Очевидно, что направленные модификации геномов практически ценных штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae* посредством редактирования анцестральных геномных элементов будут способствовать повышению эффективности препаратов, производимых на основе этих бактерий.

Авторы признательны Я.В. Пухальскому за помощь в измерении нитрогеназной активности.

[1]*ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,*
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: provorovnik@yandex.ru ✉, olony@yandex.ru, okurchak@yahoo.com, kimeklis@gmail.com, tsaksenova@mail.ru, eeandr@gmail.com;
[2]*ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный университет,*
199034 Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9,
e-mail: eeandr@gmail.com

Поступила в редакцию 28 декабря 2022 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2023, V. 58, № 1, pp. 87-99

BIODIVERSITY OF THE SYMBIOTIC SYSTEMS FORMED BY NODULE BACTERIA *Rhizobium leguminosarum* WITH THE LEGUMINOUS PLANTS OF GALEGOID COMPLEX

O.P. Onischuk[1], O.N. Kurchak[1], A.K. Kimeklis[1], T.S. Aksenova[1], E.E. Andronov[1, 2], N.A. Provorov[1] ✉

[1]*All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology,* 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail provorovnik@yandex.ru (✉ corresponding author), olony@yandex.ru, okurchak@yahoo.com, kimeklis@gmail.com, tsaksenova@mail.ru, eeandr@gmail.com;
[2]*Saint-Petersburg State University,* 7-9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034 Russia, e-mail eeandr@gmail.com
ORCID:
Onishchuk O.P. orcid.org/0000-0002-5378-7826
Kurchak O.N. orcid.org/0000-0003-3555-7426
Kimeklis A.K. orcid.org/0000-0003-0348-7021
Aksenova T.S. orcid.org/0000-0002-7294-8410
Andronov E.E. orcid.org/0000-0002-5204-262X
Provorov N.A. orcid.org/0000-0001-9091-9384
The authors declare no conflict of interests
Acknowledgements:
The authors are grateful to Ya.V. Pukhalsky for help in measuring nitrogenase activity.
Supported financially by the Russian Science Foundation under grant No. 19-16-00081П
Final revision received December 28, 2022 doi: 10.15389/agrobiology.2023.1.87eng
Accepted January 17, 2023

Abstract

Nodule bacteria of the species *Rhizobium leguminosarum* are differentiated into two biovars (bv.) that form N_2-fixing symbioses with leguminous plants of the galegoid complex, tribes *Fabeae* (genera *Lathyrus, Lens, Pisum, Vavilovia, Vicia*, symbiont — *R. leguminosarum* bv. *viciae*) and *Trifolieae* (genus *Trifolium*, symbiont — *R. leguminosarum* bv. *trifolii*) (J. Sprent et al., 2017). It was previously assumed that cross-inoculation between these biovars is impossible or rare, while data on the control of host specificity of *R. leguminosarum* were limited by interactions between pea (*P. sativum*) lines with different alleles of *Sym2* gene and bv. *viciae* strains that differ in the presence of *nod*X gene (T.A. Lie, 1978). The aim of our work was to analyze the variability of *R. leguminosarum* bv. *viciae* strains from ancestral (A) and evolutionarily advanced (D) genomic groups in terms of host specificity and N_2-fixing activity, aimed at the functional characterization of ancestral genome elements, which were previously identified by the comparative genetic analysis of strains isolated from representatives of the *Fabeae* tribe that differ in phylogenetic affiliation. In accordance with the previously proposed genotyping technique, strains were assigned to group A if they contained the *nod*X and *fix*W genes, did not contain a chromosomal copy of the *fix*NOPQ operon, and the *nod*T gene was outside the *nod* cluster. In the absence of at least one of these features, the strains were assigned to group D (E. Chirak et al., 2019). Group A strains were isolated from the relict legume *Vavilovia formosa* and from wild-growing Afghan lines of *P. sativum*, group D strains were isolated from cultivated European lines of *P. sativum*, from *Vicia sativa* and *V. alpestris.* In experiments on the analysis of cross-inoculation of two *R. leguminosarum* biovars we used bv. *viciae* strains isolated from nodules of *Vavilovia formosa, Vicia sativa, V. subrotunda*, European lines of *Pisum sativum*, Afghan lines of *P. sativum*, as well as bv. *trifolii* strains from clover (*Trifolium pratense, T. ambiguum, T. montanum*) nodules. In microvegetative experiments, plants inoculated with rhizobia were grown under gnotobiotic conditions on vermiculite. N_2-fixing activity was determined using the acetylene method based on the use of C_2H_2 as a substrate for nitrogenase. Based on the results obtained, the following symbiotic phenotypes were identified: Fix^+ — N_2-fixing (large, pink) nodules; Fix^- — non-fixing N_2 (small, white, but morphologically normal) nodules; $Fix^{+/-}$ — nodules not fixing N_2, but similar to Fix^+ nodules (large, pink); Ndv^- — non-fixing N_2, tumor-like nodules; Nod^- — nodules were absent. It turned out that 9 out of 11 strains of the ancestral group formed on clover nodules of Fix^- phenotype, and 2 strains formed nodules of Ndv^- phenotype. Among 8 strains of the evolutionarily advanced group, the Fix^- and Ndv^- phenotypes were detected in 4 and 2 strains, respectively, and 2 strains did not form nodules on clover (Nod^-), indicating a narrowing of the host specificity of rhizobia during coevolution of bv. *viciae* with host plants. Therefore, we have shown for the first time that during the transition of bv. *viciae* strains to symbiosis with evolutionarily young representatives of the tribe *Fabeae* (transition from the A- to the D-group), bacteria lose the ability to form symbiosis with a heterologous host (*Trifolium*). Among 6 strains of clover rhizobia, 4 strains showed the ability to inoculate vetch forming Fix^- nodules. In experiments to control the absence of contamination, DNA was isolated from nodules using the NucleoSpin™ Soil (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Germany), the *nod*A gene fragment was amplified using universal primers for *R. leguminosarum* biovars (ndARL302_F YTDGGMATCGC-HCACT/ndARL518_R RDACGAGBACRTCTTCRGT). The data obtained showed that under the conditions of sterile microvegetation experiments there is no contamination and the majority of strains are able for cross-inoculation: bv. *viciae* strains form nodules on clover and bv. *trifolii* form nodules on vetch. However, this ability is limited by the formation of non-fixing N_2 nodules in heterologous hosts, including morphologically abnormal (tumor-like) nodules. The study of symbioses formed by

9 species of leguminous plants of tribe *Fabeae* (*Pisum sativum, Vicia sativa, V. villosa, V. alpestris, Vavilovia formosa, Lens culinaris, L. nigricans, Lathyrus pratensis, L. sylvestris*) with 6 *R. leguminosarum* bv. *viciae* strains, demonstrated a pronounced specificity of N_2-fixing symbiosis formation, which depends mostly on the bacteria origin. Strains isolated from the same legume species (*V. formosa* or *P. sativum*) are more similar in host specificity than strains from different hosts. A hypothetical scheme of *R. leguminosarum* evolution is proposed, according to which: a) divergent evolution of bv. *viciae* is determined by host plant speciation in tribe *Fabeae*; b) the closest relative of a common ancestor of *R. leguminosarum* is represented by bv. *trifolii*, which display an evolutionary primitive *sym* gene organization and possibly originated from the ancestral bv. *viciae* strains that changed their host specificity. The rhizobia isolated from *V. formosa* may be considered as the close relatives of these ancestral strains since they exceed the pea and vetch isolates in the ability to form morphologically normal nodules with the heterologous host, clover. The data obtained show the possibility of constructing rhizobia strains with an increased symbiotic activity by editing the ancestral components of their genomes.

Keywords: nodule bacteria, leguminous plants, symbiotic N_2-fixation, host specificity, biodiversity, *Rhizobium leguminosarum*, genomic groups, evolution of symbiosis.

REFERENCES

1. Sprent J.I., Ardley J., James E.K. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytol.*, 2017, 215(1): 40-56 (doi: 10.1111/nph.14474).
2. Haag A.F., Arnold M.F., Myka K.K., Kerscher B., Dall'Angelo S., Zanda M., Mergaert P., Ferguson G.P. Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(3): 364-383 (doi: 10.1111/1574-6976.12003).
3. Provorov N.A. The interdependence between taxonomy of legumes and specificity of their interaction with rhizobia in relation to evolution of the symbiosis. *Symbiosis*, 1994, 17: 183-200.
4. Kimeklis A.K., Kuznetsova I.G., Sazanova A.L., Safronova V.I., Belimov A.A., Onishchuk O.P., Kurchak O.N., Aksenova T.S., Pinaev A.G., Musaev A.M., Andronov E.E., Provorov N.A. *Genetika*, 2018, 54(7): 851-855 (in Russ.).
5. Kimeklis A.K., Chirak E.R., Kuznetsova I.G., Sazanova A.L., Safronova V.I., Belimov A.A., Onishchuk O.P., Kurchak O.N., Aksenova T.S., Pinaev A.G., Andronov E.E. Provorov N.A. Rhizobia isolated from the relict legume *Vavilovia formosa* represent a genetically specific group within *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Genes*, 2019, 10(12): 991 (doi: 10.3390/genes10120991).
6. Chirak E.R., Kimeklis A.K., Karasev E.S., Kopat V.V., Safronova V.I., Belimov A.A., Aksenova T.S., Kabilov M.R., Provorov N.A., Andronov E.E. Search for ancestral features in genomes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains isolated from the relict legume *Vavilovia formosa*. *Genes*, 2019, 10(12): 990 (doi: 10.3390/genes10120990).
7. Vishnyakova M., Burlyaeva M., Akopian J., Murtazaliev R., Mikič A. Reviewing and updating the detected locations of beautiful vavilovia (*Vavilovia formosa*) on the Caucasus *sensu stricto*. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 2016, 63: 1085-1102 (doi: 10.1007/s10722-016-0440-x).
8. Lie T.A. Symbiotic specialization in pea plants: the requirement of specific *Rhizobium* strains for peas from Afghanistan. *Ann. Appl. Biol.*, 1978, 88(3): 462-465.
9. Abicht H.K., Schärer M.A., Quade N., Ledermann R., Mohorko E., Capitani G., Hennecke H., Glockshuber R. How periplasmic thioredoxin TlpA reduces bacterial copper chaperone ScoI and cytochrome oxidase subunit II (CoxB) prior to metallation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(47): 32431-32444 (doi: 10.1074/jbc.M114.607127).
10. Kopat' V.V., Chirak E.R., Kimeklis A.K., Safronova V.I., Belimov A.A., Kabilov M.R., Andronov E.E., Provorov N.A. *Genetika*, 2017, 53(7): 795-804 (doi: 10.7868/S0016675817070062) (in Russ.).
11. Provorov N.A., Andronov E.E., Kimeklis A.K., Onishchuk O.P., Igolkina A.A., Karasev E.S. Microevolution, speciation and macroevolution in rhizobia: genomic mechanisms and selective patterns. *Front. Plant Sci.*, 2022, 13: 1026943 (doi: 10.3389/fpls.2022.1026943).
12. Kimeklis A.K., Safronova V.I., Kuznetsova I.G., Sazanova A.L., Belimov A.A., Pinaev A.G., Chizhevskaya E.P., Pukhaev A.R., Popov K.P., Andronov E.E., Provorov N.A. Phylogenetic analysis of *Rhizobium* strains, isolated from nodules of *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [*Agricultural Biology*], 2015, 50(5): 655-664 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.5.655eng).
13. Rumyantseva M.L., Simarov B.V., Onishchuk O.P., Andronov E.E., Chizhevskaya E.P., Belova V.S., Kurchak O.N., Muntyan A.N., Rumyantseva T.B., Zatovskaya T.V. *Biologicheskoe raznoobrazie kluben'kovykh bakteriy v ekosistemakh i agrotsenozakh. Teoreticheskie osnovy i metody* /Pod redaktsiey M.L. Rumyantsevoy, B.V. Simarova [Biological diversity of nodule bacteria in ecosystems and agrocenoses. Theoretical foundations and methods. M.L. Rumyantseva, B.V. Simarov (eds.),]. St. Petersburg, 2011 (in Russ.).
14. Lakin G.F. *Biometriya* [Biometrics]. Moscow, 1990 (in Russ.).
15. Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 2001, 4(1): 1-9.

16. Andronov E.E., Onishchuk O.P., Kurchak O.N., Provorov N.A. *Mikrobiologiya*, 2014, 83(4): 500-508 (doi: 10.7868/S0026365614030033) (in Russ.).
17. Provorov N.A., Tikhonovich I.A. *Rekonstruktsiya organellogeneza* [Reconstruction of organellogenesis]. St. Petersburg, 2022 (in Russ.).
18. Onishchuk O.P., Provorov N.A., Vorob'ev N.I., Simarov B.V. Estimation of phenotypic presentations of bacterial genes, controlling the efficiency of nitrogen-fixing symbiosis with plants. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [*Agricultural Biology*], 2011, 1: 32-42 (in Eng.).
19. Cevallos M.A., Encarnacion S., Leija A., Mora Y., Mora J. Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly-β-hydroxybutyrate. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(6): 1646-1654 (doi: 10.1128/jb.178.6.1646-1654.1996).
20. Mandon K., Michel-Reydellet N., Encarnacion S., Kaminski P.A., Leija A., Cevallos M.A., Elmerich C., Mora J. Poly-β-hydroxybutyrate turnover in *Azorhizobium caulinodans* is required for growth and affects *nifA* expression. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(19): 5070-5076 (doi: 10.1128/JB.180.19.5070-5076.1998).
21. Zatovskaya T.V. *Poluchenie i analiz Tn5-mutantov Sinorhizobium meliloti s izmenennymi poverkhnostnymi polisakharidami. Avtoreferat kandidatskoy dissertatsii* [Construction and characterization of S*inorhizobium meliloti* Tn5 mutants with altered surface polysaccharides. PhD thesis]. St. Petersburg, 2012 (in Russ.).
22. Marroqui S., Zorreguieta A., Santamaria C., Temprano F., Soberon M., Megías M., Downie A.J. Enhanced symbiotic performance by *Rhizobium tropici* glycogen synthase mutants. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(3): 854–864 (doi: 10.1128/JB.183.3.854-864.2001).
23. Sharypova L.A., Onishchuk O.P., Chesnokova O.N., Fomina-Eshchenko J.G., Simarov B.V. Isolation and characterization of *Rhizobium meliloti* Tn5 mutants showing enhanced symbiotic effectiveness. *Microbiology*, 1994, 140(3): 463-470 (doi: 10.1099/00221287-140-3-463).
24. Yurgel' S.N., Sharypova L.A., Simarov B.V. *Genetika*, 1998, 34(6): 737-741 (in Russ.).
25. Sharypova L.A., Yurgel S.N., Keller M., Simarov B.V., Pühler A., Becker A. The *eff*-482 locus of *Sinorhizobium meliloti* CXM1-105 that influences symbiotic effectiveness consists of three genes encoding an endoglucanase, a transcriptional regulator and an adenylate cyclase. *Mol. Gen. Genet.*, 1999, 261(6): 1032-1044 (doi: 10.1007/s004380051052).
26. Janczarek M., Jaroszuk-Ściseł J., Skorupska A. Multiple copies of *rosR* and *pssA* genes enhance exopolysaccharide production, symbiotic competitiveness and clover nodulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Antonie van Leewenhoek*, 2009, 96(4): 471-486 (doi: 10.1007/s10482-009-9362-3).
27. Van Dillewijn P., Soto M., Villadas P., Toro N. Construction and environmental release of a *Sinorhizobium meliloti* strain genetically modified to be more competitive for alfalfa nodulation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(9): 3860-3865 (doi: 10.1128/AEM.67.9.3860-3865.2001).
28. Mavingui P., Flores M., Romero D., Martinez-Romero E., Palacios R. Generation of *Rhizobium* strains with improved symbiotic properties by random DNA amplification (RDA). *Nat. Biotechnol.*, 1997, 15: 564-569 (doi: 10.1038/nbt0697-564).
29. Sugawara M., Sadowsky M.J. Enhanced nodulation and nodule development by *nol*R mutants of *Sinorhizobium medicae* on specific *Medicago* host genotypes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2014, 27(4): 328-335 (doi: 10.1094/MPMI-10-13-0312-R).
30. Ampomah O.Y., Jensen J.B., Bhuvaneswari T.W. Lack of tregalose catabolism in *Sinorhizobium* species increases their nodulation competitiveness on certain host genotypes. *New Phytologist*, 2008, 179(2): 495-504 (doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02460.x).
31. Frederix M., Edwards A., Swiderska A., Stanger S., Karunakaran R., Williams A., Abbruscato P., Sanchez-Contreras M., Poole P.S., Downie J.A. Mutation of *praR* in *Rhizobium leguminosarum* enhances root biofilms, improving nodulation competitiveness by increased expression of attachment proteins. *Molecular Microbiology*, 2014, 93(3): 464-478 (doi: 10.1111/mmi.12670).
32. Pellock B.J., Cheng H.-P., Walker G.C. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(15): 4310-4318 (doi: 10.1128/JB.182.15.4310-4318.2000).
33. Aksenova T.S., Chirak E.R., Onishchuk O.P., Kurchak O.N., Afonin A.M., Pinaev A.G., Andronov E.E., Provorov N.A. Identification of the ancestral characteristics in the genome of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [*Agricultural Biology*], 2020, 55(3): 489-498 (doi: 10.15389/agrobiology.2020.3.489eng).
34. Govorov L.I. V knige: *Kul'turnaya Flora SSSR. Tom IV. Zernovye bobovye* [In: Cultural flora of the USSR. Volume IV. Cereal legumes]. Moscow, 1937: 229-336 (in Russ.).
35. Lukjanová E., Řepková J. Chromosome and genome diversity in the genus *Trifolium* (*Fabaceae*). *Plants*, 2021, 10(11): 2518 (doi: 10.3390/plants10112518).
36. Pariyskaya A.N. *Uspekhi mikrobiologii*, 1975, 10: 189-200 (in Russ.).