

Обзоры, проблемы

УДК 633.31:631.461.52:577.21

doi: 10.15389/agrobiologia.2019.5.847rus

**КЛУБЕНЬКОВЫЕ БАКТЕРИИ: ПЕРСПЕКТИВЫ МОНИТОРИНГА СИМБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ\***  
(обзор)

М.Л. РУМЯНЦЕВА

Люцерна и соя — широко возделываемые хозяйственно ценные кормовые и зернобобовые культуры, урожайность которых напрямую зависит от бактериальных микросимбионтов. Обработка семян бобовых растений штаммами клубеньковых бактерий (ризобии) способствует повышению продуктивности растительно-микробной системы как в типовых, так и в неблагоприятных условиях выращивания, например на деградированных почвах (подвергнуты засолению, заболачиванию, засухливости и т.д.). Именно поэтому получение новых штаммов, способных формировать высокопродуктивные и стрессоустойчивые симбиотические системы с бобовыми растениями, крайне востребовано в сельском хозяйстве. Современные технологии получения высокопродуктивных и экологически дифференцированных сортов бобовых культур предполагают использование биогеоценотического подхода на основе учета симбиотрофных показателей (З.Ш. Шамсутдинов, 2014). Формирование высокопродуктивных растительно-микробных систем основано на принципе дополнителности геномов макро- и микросимбионта (И.А. Тихонович с соавт., 2015), комплексность взаимодействия которых обуславливает успешность их внедрения в агроценозы, различающиеся по агроклиматическим и почвенным условиям. К симбиотически значимым и генетически детерминированным свойствам клубеньковых бактерий относят вирулентность, конкурентоспособность, специфичность и эффективность азотфиксирующей активности, которые ризобии проявляют по отношению к определенному виду, а подчас и сорту бобового растения-хозяина. Все вышеперечисленные симбиотически значимые характеристики детерминируются многочисленными группами генов ризобий. В обзоре представлен анализ сведений о генах микросимбионтов сои и люцерны, для которых экспериментально доказано участие в контроле симбиотической активности и стрессоустойчивости. Клубеньковые бактерии видов *Sinorhizobium meliloti*, *S. fredii* и *Bradyrhizobium japonicum* — это наиболее изученные, но контрастно различающиеся по генетическим и морфофизиологическим характеристикам бактерии. Сопоставление современных публикаций по основным группам симбиотически значимых генов (*nod* гены, участвующие в синтезе и декорировании сигнальной молекулы Nod-фактора, которая обуславливает инициацию клубенькообразования при растительно-микробном взаимодействии; группы *nif*, *fix* и *eff* генов, ответственных за процесс азотфиксации и за симбиотическую эффективность) показывает, что эти исследования как для быстро-, так и для медленнорастущих видов ризобий все еще разобщены, а полученные результаты фрагментарны. Вместе с тем, согласно опубликованным данным, аллельный полиморфизм по указанным генам играет важную роль в вариации сигналинга, хозяйской специфичности и симбиотической эффективности клубеньковых бактерий. Сделано заключение, что сопряженный анализ последовательностей генов интереса из функционально различных групп генов, вовлеченных в формирование высокоэффективных стрессоустойчивых симбиозов, — *sym* (symbiotic; симбиоз), *srg* (stress related genes; гены устойчивости к стрессовым факторам) и QS (quorum sensing genes; гены кворум сенсинга), или *sym-srg*-QS генов, перспективен для поиска и создания молекулярных маркеров симбиотических и адаптивных свойств клубеньковых бактерий, что необходимо для мониторинга генетической структуры штаммов при лабораторных исследованиях, в биопрепаратах и в микробиоме агроценоза.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium fredii*, *Bradyrhizobium japonicum*, люцерна, соя, гены симбиотической активности, эффективности, устойчивости к абиотическим стрессам.

Люцерна и соя — наиболее широко возделываемые хозяйственно ценные культуры во всем мире, что обуславливает огромный интерес к их бактериальным микросимбионтам. Современные технологии получения высокопродуктивных и экологически дифференцированных сортов бобовых культур предполагают использование биогеоценотического подхода, в основе которого метод симбиотической селекции (1). Именно использование

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 14.607.21.0178, RFMEF160717X0178).

технологии, основанной на применении генетически подобранных штаммов клубеньковых бактерий (ризобии), позволило значительно сократить сроки получения новых сортов люцерны.

В основе метода лежит принцип дополнительности геномов макро- и микросимбионта (2, 3), комплементарность взаимодействия которых предопределяет фитнес растительно-микробных систем в природных экосистемах и агроценозах. К симбиотически значимым и генетически детерминируемым свойствам клубеньковых бактерий относят вирулентность, конкурентоспособность, специфичность и эффективность азотфиксирующей активности, которые ризобии проявляют по отношению к определенному виду/сорту бобового растения-хозяина. Обработка семян бобовых штаммами ризобий способствует повышению симбиотической продуктивности растений как в типовых, так и в неблагоприятных условиях выращивания, например на деградированных почвах, в числе которых подвергнутые засолению, заболачиванию, засушливости и т.д. (4-6). Именно поэтому получение новых штаммов, способных формировать высокопродуктивные и стрессоустойчивые симбиотические системы с бобовыми растениями, крайне востребовано в сельском хозяйстве (7, 8).

Традиционно поиск штаммов клубеньковых бактерий, перспективных для практического использования, проводят по результатам многолетних и трудоемких деляночных и полевых опытов. В результате среди испытываемых штаммов выделяют те, в симбиозе с которыми у растений были отмечены значительные положительные биометрические (высота, развитие корневой системы и т.д.), биохимические (содержание азота) и симбиотрофные (прибавки зеленой или сухой массы) изменения (1, 4, 5, 9, 10). Все перечисленные выше характеристики рассматривают как качественные и количественные показатели симбиотической активности и эффективности штаммов клубеньковых бактерий. Однако прибавки зеленой или сухой массы растений, полученные от инокуляции селекционно подобранными штаммами, со временем могут снижаться (11), из-за чего к штаммам, имеющим практическую значимость, применяют метод поддерживающей селекции, предполагающий периодическое получение новых клонов и анализ их симбиотических свойств в многократных микровегетационных, а затем и вегетационных опытах (12, 13). Поэтому разработка современных подходов поиска, селекции и мониторинга штаммов, обладающих повышенными симбиотическими показателями, на основе молекулярно-генетических методов представляется крайне актуальной и востребованной.

По современным представлениям, причиной снижения или утраты симбиотической активности и эффективности штаммами ризобий может быть нестабильность их симбиотического генома (14). Под последним понимают комплекс *sym* генов (структурных и регуляторных), обуславливающих различные этапы микробно-растительного взаимодействия, который был сформирован в процессе коэволюции клубеньковых бактерий с бобовыми растениями-хозяевами. Согласно опубликованным данным, количество *sym* генов как у медленнорастущих, так и у быстрорастущих клубеньковых бактерий (соответствующими примерами служат представители родов *Bradyrhizobium* и *Sinorhizobium*) составляет не менее пяти сотен (15). Среди генов, вовлеченных в проявление вирулентности, сопряженной с процессом клубенькообразования, выделяют группу общих *nod* генов, которые встречаются практически у всех известных видов ризобий, поскольку эти гены детерминируют синтез сигнальных молекул микробно-растительного взаимодействия (Nod-факторы) (16). Гены, детерминирующие симбиотическую активность, как правило, расположены на одной или не-

скольких плаزمидах либо входят в состав геномного острова, локализованного на хромосоме, что и обуславливает потенциальную возможность утраты как отдельных *sym* генов, так и их кластеров, особенно под влиянием различных абиотических стресс-факторов (17, 18). Поэтому генотипическая оценка штаммов на наличие генов, детерминирующих формирование и функционирование симбиоза, а также генов, вовлеченных в стрессоустойчивость бактерий, представляется крайне необходимой.

В настоящем обзоре представлен анализ данных о генах, для которых экспериментально доказано участие в контроле симбиотической активности и стрессоустойчивости у клубеньковых бактерий видов *Sinorhizobium* и *Bradyrhizobium* — наиболее изученных, но контрастно различающихся по генетическим и фенотипическим характеристикам. Группы таких генов, обещая для быстро- и медленно растущих видов ризобий, могут быть рекомендованы для поиска соответствующих генов-кандидатов и создания на их основе молекулярных маркеров, перспективных для современных селекционно-генетических исследований, включающих анализ стабильности генома и наследования симбиотических признаков у клубеньковых бактерий.

Симбионты сои и люцерны. Высокоэффективный симбиоз с культурными сортами сои *Glycine max* (L.) Мегг. формируют на нейтральных или слабокислых почвах медленно растущие ризобии вида *B. japonicum*, а также *B. elkanii* (19-21). На щелочных почвах некоторые сорта культурной сои вступают в симбиоз с быстрорастущими ризобиями вида *S. fredii* — типичными симбионтами дикорастущих родственников сои *G. soja*, которая широко используется в программах селекционного улучшения *G. max* по многим хозяйственно ценным признакам. Высказано мнение, что применение быстрорастущих бактерий вида *S. fredii* может иметь экологическую и практическую значимость при инокуляции культурных сортов сои, так как это будет способствовать интенсификации аграрного производства (22). Симбионтами многолетней тетраплоидной люцерны (*Medicago varia*) выступают ризобии быстрорастущего вида *S. meliloti*, однако в природных условиях симбионтами люцерны также могут быть штаммы близкородственного вида *S. medicae*, преимущественно формирующие эффективный симбиоз с однолетними диплоидными сортами люцерны.

Таким образом, и соя, и люцерна образуют эффективный симбиоз с определенными видами клубеньковых бактерий и неэффективный — с бактериями близкородственных, а нередко и неродственных видов ризобий, что, естественно, приводит к значительным потерям урожая. Следовательно, характеристика видовой принадлежности штаммов клубеньковых бактерий обязательна для оценки перспектив их симбиотической эффективности. Наилучшим образом зарекомендовал себя метод анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, который позволяет характеризовать штаммы не только на уровне вида, но и выделять геновиды (genospecies) ризобий (23, 24). Также нередко прибегают к анализу межгенной последовательности *rrn-rrl* рибосомального оперона (ITS, intergenic sequence) или ее участков, например, *hin*-региона (25-27). Анализ указанных последовательностей позволяет определять не только видовую принадлежность штаммов, но и получать их штаммоспецифичные характеристики на уровне хромосомных маркеров (28), что, однако, не гарантирует наследования штаммом/штаммами генетических детерминант стрессоустойчивости и симбиотической активности.

Гены, детерминирующие симбиотическую активность, имеют разную локализацию в геномах клубеньковых бактерий родов *Bradyrhizobium* и *Sinorhizobium*. У быстрорастущих видов *S. meliloti* и *S. fredii sym* гены рас-

положены на одной-двух высокомолекулярных мегаплазидах размером более 0,8-1,0 млн п.н., но также могут встречаться в составе хромосомы (размер  $\geq 3,6$  млн п.н.) и криптических плазмид (от 30 до 600 т.п.н.), число которых у разных штаммов варьирует от 0 до 5 (29). У медленнорастущих бактерий рода *Bradyrhizobium* аналогичные гены входят в состав так называемого симбиотического острова, локализованного на хромосоме, размер которого варьирует от 643 до 998 т.п.н. (30, 31). Симбиотические острова имеют мозаичную структуру, поскольку для них характерно чередование значащих последовательностей, детерминирующих симбиотическую активность, с последовательностями, которые не влияют на проявление симбиотических свойств или являются незначимыми (30, 31). Симбиотические острова относятся к типу геномных островов, которые описаны и у быстрорастущих видов клубеньковых бактерий. Однако в случае последних гены, имеющие отношение к симбиотической активности или к фитнесу ризобий, чаще единичны и встречаются гораздо реже (32). Геномные острова клубеньковых бактерий способны существенно влиять на функциональную активность генов, расположенных на хромосоме и/или на плазидах и могут участвовать в горизонтальном переносе генов в экосистемах (32-34). Поэтому оценка наличия в геномах высокоэффективных штаммов клубеньковых бактерий геномных островов крайне важна и имеет непосредственное отношение к направленному получению генетически стабильных штаммов, используемых для биопрепаратов.

Группа *nod* генов. Эта группа детерминирует/регулирует синтез сигнальных молекул (или Nod-факторов), необходимых для инициации процесса формирования клубеньков на корнях растения-хозяина, и наиболее хорошо изучена у клубеньковых бактерий рассматриваемых видов. На примере штамма *B. japonicum* USDA110 показано, что медленнорастущие брадиризобии содержат два оперона — *nodYABCSUIJnolMNOnodZ* и *nolYZ*, ответственных за синтез коровой части сигнальной молекулы, тогда как быстрорастущие симбионты сои *S. fredii* (штаммы HH103 и USDA257) имеют один оперон, включающий гены *nodABCDEFGHIJnolOnoeI* (16, 35). В случае симбионтов люцерны *nod* гены организованы в пять оперонов: *nodABCDEFGHI*, *nodFEGPQ*, *nodH*, *nodMnolFGnodN* и *nodLnoeAB* (штамм *S. meliloti* Rm1021) (36). Следует отметить, что представление об организации, а также о функциональной роли *nod* генов получено на основании изучения единичных штаммов, в числе которых и вышеуказанные. Известно, что направленное изменение структуры даже одного из так называемых общих *nod* генов приводит к существенным изменениям в образовании клубеньков и, как правило, к снижению либо утрате симбиотической активности (37).

Активность общих *nod* генов ризобий регулируется продуктом гена *nodD1*, который в случае *S. meliloti* играет более важную роль, чем его ортологи *nodD2* и *nodD3* (38). Индуктором *nodD1* служат флавоноиды, входящие в состав корневых экссудатов растений-хозяев, но индукторами могут быть и бетаины (осмопротекторы), также присутствующие в составе корневых экссудатов люцерны. Степень гомологии генов *nodD1* штамма *S. meliloti* Rm2011 и типовых штаммов *B. japonicum* и *B. elkanii* не превышает 75 % (на аминокислотном уровне), тогда как гомология между указанными генами двух последних видов составляет 92 %. При этом гены *nodD1* *B. japonicum* и *B. elkanii* активируются разными флавоноидами, на основании чего было высказано предположение, что анализ аллельного полиморфизма *nodD1* у природных штаммов брадиризобий может быть перспективен для выявления штаммов, различающихся по хозяйской специфичности (39). Также важную роль в регуляции *nod* генов брадиризобий

играет ген *nodD2*, который, в свою очередь, находится под контролем гена *nolA* (40). На примере штамма *B. japonicum* USDA110 показано участие этого гена в контроле хозяйской специфичности: мутанты по гену *nolA* образовывали клубеньки на сое значительно позже родительского штамма и не формировали их на корнях растений *Vigna unguiculata* (41). К генам, вовлеченным в контроль хозяйской специфичности у *B. japonicum*, следует отнести и двухкомпонентную систему регуляторных генов *nodVW*, которые активируются флавоноидом генистеином (39). Однако активность этих генов необходима брадиризибиям для формирования клубеньков на корнях сиратро (*Macroptilium atropurpureum*) и вигны, но не на сое (39). Помимо рассмотренных регуляторов, секреторная защитная система TTSS (Type III Secretion System), которая у *B. japonicum* и *S. fredii* находится под контролем *nodD1*, также участвует во взаимодействии ризобий с определенными растениями-хозяевами (42-44). Высокая активность соответствующих *its* генов отмечена на начальных этапах образования клубеньков, тогда как мутанты по этим генам были неспособны формировать клубеньки на корнях ряда растений-хозяев (42-44).

Особая роль принадлежит *nod* генам, вовлеченным в процессы структурной модификации (или так называемого декорирования) кора Nod-фактора, что делает молекулу сигнального фактора видоспецифичной. Например, наличие сульфатной группы на редуцируемом конце молекулы Nod-фактора *S. meliloti* обязательно для формирования симбиоза с люцерной, что было доказано при изучении соответствующих мутантов (45). Процесс сульфатирования Nod-фактора осуществляется продуктом гена *nodH* с участием продуктов двух других генов — *nodP* и *nodQ*. Вместе с тем в природных условиях были выявлены штаммы, формировавшие симбиоз с люцерной на кислых почвах, сигнальные молекулы которых не имели сульфатной группы (45). У *S. fredii* сигнальные молекулы сульфатированы, однако процесс декорирования Nod-фактора включает также этапы фукозилирования и метилирования фукозилированного остатка на редуцируемом конце сигнальной молекулы с участием гена *noeJ* и кластера генов *nolK-noeL-nodZ-noeK* (46). Аналогичный кластер присутствует у *B. japonicum*, но включает еще два гена — *nolL* и *noeE*, участвующие в метилировании сигнальной молекулы.

Сигнальные молекулы быстро- и медленно растущих симбионтов сои имеют структурные различия: у брадиризибий они ацетилированы, тогда как у синоризибий — не карбамоилированы по нередуцируемому концу молекулы (47). Процесс карбамоилирования находится под контролем генов *nolO* и *nodU*. Установлено, что все изученные штаммы *S. fredii* (NH103, 042B, USDA192, USDA193 и USDA257) имели инсерцию и стоп-кодон в гене *nolO*, и только у вышеуказанных двух первых штаммов были выявлены также структурные изменения в гене *nodU* (47). Очевидно, что гены, вовлеченные в процесс декорирования сигнальной молекулы, такие как *nolO* и *nodH*, могут представлять интерес как гены-кандидаты при выявлении маркерных последовательностей для экспресс-поиска быстрорастущих симбионтов соответственно у сои и люцерны.

Следует отметить, что вопрос о взаимосвязи структурного полиморфизма *nod* генов со структурой сигнальных молекул, а также с их опосредованным влиянием на симбиотический потенциал штаммов клубеньковых бактерий остается практически не изученным. Согласно исследованиям, выполненным в нашей лаборатории, географически изолированные природные популяции *S. meliloti* характеризуются высоким полиморфизмом общих *nod* генов, а также видоспецифичного гена *nodH* (в сравнении

с референсным штаммом Rm1021) (48). Показано, что природные штаммы *S. meliloti*, имевшие дивергентные аллели указанных генов (относительно референсного штамма), формировали эффективный симбиоз преимущественно с однолетними видами люцерны в типовых для ее роста условиях, тогда как при модельном засолении отмечались различия между штаммами по способности формировать эффективный симбиоз с разными видами люцерны (49). Исследование *in silico* позволило выявить для разных видов ризобий наличие положительной корреляции между изменениями в структуре гена *nodA* и типом синтезируемых Nod-факторов (50). На основе полученных данных авторы предложили использовать анализ гена *nodA* для поиска симбиотически активных штаммов ризобий, обладающих определенной хозяйской специфичностью, в различных экологических нишах (50).

Таким образом, анализ имеющихся в литературе данных о структурной организации *nod* генов, участвующих в синтезе и декорировании сигнальной молекулы Nod-фактора, позволяет рассматривать аллельный полиморфизм *nod* генов как фактор, играющий важную роль в вариации сигналинга и хозяйской специфичности как у быстро-, так и у медленно-растущих видов клубеньковых бактерий.

Группы *nif*, *fix* и *eff* генов. Эти гены клубеньковых бактерий ответственны соответственно за процесс азотфиксации и симбиотическую эффективность. Гены *nif* детерминируют синтез фермента нитрогеназы, благодаря которому происходит трансформация азота в соединения, доступные для метаболизма растений. Наиболее часто в опубликованных исследованиях описывается анализ двух генов (*nifDK* и *nifH*, кодируют ферментный комплекс) из 20 описанных у *Klebsiella pneumonia* (39, 51). Структура *nif* генов практически идентична у таксономически различных микроорганизмов, тогда как их организация и регуляция неодинаковы. Анализ этих генов нередко используют для оценки потенциальной способности к азотфиксации у вновь выявляемых штаммов микроорганизмов (52).

Группы *fix* и *eff* генов характеризуют как гены, детерминирующие так называемый центральный промежуточный метаболизм (39, 41). Гены *B. japonicum* или *S. meliloti* с высокой экспрессией в бактериоидах составляют около 15-16 % относительно их числа у сапрофитных форм бактерий. Общее число генов, участвующих в регуляции симбиотической активности, существенно различается у ризобий рассматриваемых видов, а также неодинаково у штаммов одного вида и зависит от условий эксперимента (53). Так, число генов, активность которых изменяется (повышается или снижается) в результате симбиотического взаимодействия, для *S. meliloti* — 982 или 1288, для *B. japonicum* — 1234 или 2778 (53). Если сравнить долю генов, для которых отмечено повышение экспрессии, то в случае синоризобий она составляет 37 %, а в случае брадиризобий — 54 %, при этом функции подавляющего числа этих генов остаются неизвестными (53, 54).

В базе данных PubMed NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) имеется более шести десятков публикаций, включающих сведения о генах бактерий родов *Bradyrhizobium* и *Sinorhizobium*, которые вовлечены в проявление симбиотической эффективности и могут классифицироваться как *fix* и *eff*, однако число генов ризобий каждого рода, непосредственно изученных в этом отношении, не превышает и двух десятков. Вплоть до настоящего времени отсутствует систематизация данных по указанным генам — по-видимому, из-за того, что их действие опосредовано и/или кодируемые ими продукты участвуют в разных клеточных процессах. Например, гены *fixNOQP* детерминируют синтез *sbb3*-цитохромоксидазы, играющей ключевую роль в формировании окислительно-восстановитель-

ного потенциала (редокс-потенциал) бактериоидов (55). Мы соотнесли продукты *fixB*, *fixC*, *fixU*, *fixX*, *fixO* и *fixQ* генов *B. japonicum* с соответствующими COG группами (cluster of orthologous groups, кластеры ортологичных генов) широко используемой системы классификации белковых продуктов (56). Оказалось, что продукты указанных генов относятся преимущественно к группе С (метаболизм, связанный с энергетическими процессами), тогда как продукты генов *fixK2* и *fixN* — соответственно к группе Т (механизмы сигнальной трансдукции) и Р (транспорт неорганических ионов и метаболизм). Кроме того, среди генов, влияющих на симбиотическую активность *B. japonicum*, встречаются гены, детерминирующие синтез ферредоксина (*fdxN*; COG группа С), АСС-дезаминазы (*acdS*; группа Е), гидролазы (*blr6420*; группа С), гомологичной продукту гена *pobA* (участвует в конверсии гидроксibenзоата), а также транскрипционного фактора (*blr6378*; группа К). Следовательно, гены *B. japonicum*, которые вовлечены в контроль симбиотической эффективности, преимущественно относятся к COG группам и связаны с метаболизмом аминокислот, а также с энергетическим обменом.

Аналогичные группы *fix* и *eff* генов у *S. meliloti* расположены на мегаплазидах, а также на хромосоме. Анализ Tn5 мутантов устойчивого к стрептомицину штамма СХМ1-105, который был получен на основе производного штамма 425а, широко использовавшегося для приготовления биопрепаратов в 1980-1990-х годах, позволил впервые выявить 12 новых генов, вовлеченных в контроль симбиотической эффективности (57-59). Прибавки сухой массы растений люцерны, инокулированных такими транспозантами, составляла от 15 до 34 %. Анализ продуктов этих генов показал, что из них 42 % ответственны за транспорт и метаболизм неорганических ионов (COG группа Р), а остальные вовлечены в транспорт и метаболизм аминокислот (COG группа Е) и углеводов (COG группа G). Также выявлены гены, продукты которых связаны с клеточными процессами и сигналингом (COG группа М) и с хранением и переработкой информации (COG группа К). Следовательно, гены *S. meliloti*, участвующие в контроле симбиотической эффективности, многочисленны, а их продукты относятся к большему числу разных COG групп, чем у рассмотренных выше представителей *B. japonicum*.

Таким образом, гены, вовлеченные в контроль симбиотической эффективности растительно-микробных систем, сформированных на основе сои или люцерны, в обоих случаях многочисленны. При этом указанные гены преимущественно вовлечены у *B. japonicum* в метаболические процессы, тогда как у *S. meliloti* — в разнообразные клеточные процессы. Кроме того, гомологичные гены у рассматриваемых видов ризобий могут иметь или не иметь отношение к регуляции симбиотической эффективности. Как недавно показано, ген *rirA* у *S. fredii* НН103 вовлечен не только в метаболизм железа, но и непосредственно влияет на симбиотическую эффективность, тогда как для *S. meliloti* такого не установлено (60). Описанные выше различия между рассматриваемыми видами по генам, вовлеченным в контроль симбиотической эффективности, указывают прежде всего на крайнюю ограниченность наших знаний об этом процессе. Заметим, что природные штаммы, как сообщалось (47, 61), могут не иметь тех или иных генов или же несут аллели генов интереса, в которых произошли функционально значимые структурные изменения. По-видимому, анализ природного полиморфизма аллелей уже выявленных генов-кандидатов — это один из подходов к изучению регуляции симбиотической эффективности у ризобий.

Группа генов, вовлеченных в контроль фитнеса бактерий. Под фитнесом понимают способность микроорганизмов занимать различные экологические ниши, причем среди последних рассматривают и формирование мутуалистической формы симбиоза. Успешное противостояние биотическим и абиотическим факторам почвенной среды (температура, влажность, рН среды, поллютанты, осмотический стресс, в частности засоление) благоприятствует увеличению численности популяций. В то же время устойчивость бактерий, например, к высушиванию (температура, влажность, осмотический стресс) — технологический параметр, который важен при предпосевной обработке семян (62-64). Поэтому повышение устойчивости штаммов к разным абиотическим факторам имеет практическую значимость. К наиболее распространенным модельным воздействиям абиотических факторов можно отнести засушливость и засоление (64, 65).

Повышение устойчивости к высокой осмолярности достигается у бактерий в процессе аккумуляции различных ионов или соединений, среди которых  $K^+$ , аминокислоты (например, глутамат), углеводы (в том числе трегалоза) или осмопротекторы (эктоин, глицин, бетаин и холин). Ризобии *S. meliloti* можно отнести к умеренным галотолерантам, поскольку более 71 % их природных штаммов хорошо растут при 0,6 М NaCl (65). В настоящее время у бактерий этого вида выявлено не менее шести групп генов, участвующих в ответах на разные типы стресса, которые далее обозначены как *srg* (stress related genes) гены. Устойчивость к засолению предопределяется активностью *bet*, *pro*, *tre*, а к низким значениям рН — *act*, *ots* и *hpr* группами генов. Интересно, что продукты этих генов, имеющие отношение к различным метаболическим процессам, влияют и на симбиотическую активность. Например, гены синтеза бетаина *S. meliloti* (*bet* гены) участвуют в путях метаболизма углерода и азота (65). Нами ранее показано, что природные штаммы *S. meliloti*, у которых выявлены определенные аллели *bet* генов, имеют солеустойчивый фенотип (устойчивы к повышенным концентрациям соли) и достоверно чаще формируют растительно-микробные системы с повышенной симбиотической эффективностью, проявляемой в микровегетационных опытах как в норме, так и при засолении (47, 65).

Бактерии *B. japonicum*, наоборот, плохо растут уже при 0,05 М NaCl, то есть проявляют солечувствительность. Недавно показано, что штаммы *B. japonicum* с повышенной каталазной активностью способны к росту на средах с 0,15 М NaCl (66). Согласно данным транскриптомного анализа, в геноме *B. japonicum* выявлен 441 ген, изменявший активность при 0,05 М NaCl (53). Для 13 генов установили наибольшее повышение активности, и эти гены (за исключением *rpoH2*) охарактеризовали как родоспецифичные, поскольку у *S. meliloti* они не были ассоциированы с солеустойчивостью (53). По-видимому, чувствительность брадиризобий к осмотическому стрессу обусловлена отсутствием у них транспортных систем типа ВССТ (бетаин, карнитин, холин), характерных, например, для *S. meliloti* (67). Экспериментально установлено, что штаммы *B. japonicum*, способные утилизировать трегалозу, формировали симбиоз повышенной эффективности (67). Высказано мнение, что отбор брадиризобий по генам *ecfG*, *nepR* и *phyR*, продукты которых вовлечены в каскадную регуляцию устойчивости к общим стрессам, а также по генам локуса *bll/r1465-69*, участвующего в ответе на температурный шок и действие УФ-лучей, может быть перспективным для выявления стрессоустойчивых штаммов (68, 69), а указанные гены-кандидаты могут быть использованы для создания соответствующих мар-

кernых последовательностей.

Следует заключить, что *srg* гены, вовлеченные в формирование стрессоустойчивости, присутствуют в геномах не только быстрорастущих и солеустойчивых видов ризобий рода *Sinorhizobium*, но и медленно растущих солеустойчивых видов рода *Bradyrhizobium*. Активность этих генов у бактерий обоих родов сопряжена с процессами центрального метаболизма и оказывает непосредственное влияние на эффективность симбиотического растительно-микробного взаимодействия и фиксации азота. Все это доказывает, что оценка генов, вовлеченных в устойчивость к различным стрессовым факторам перспективна в практическом аспекте.

Устойчивость почвенных бактерий к неблагоприятным факторам окружающей среды также зависит от их способности синтезировать полисахариды. Это разнообразные макромолекулы, связанные или не связанные с клеточной стенкой, но имеющие широкий спектр биологических функций — от сигнальной до защитной. Полисахариды обеспечивают бактериям устойчивость к высыханию, температурным перепадам, бактериофагам, к специфичному и неспецифичному иммунитету растения-хозяина и т.д. Эти соединения могут обладать адгезивными характеристиками, которые позволяют бактериям колонизировать различные поверхности (образовывать микроколонии и/или биопленки). Таким образом, полисахариды обуславливают фитнес ризобий, позволяя им занимать практически любую экологическую нишу, в том числе колонизировать корни бобовых, а также оказывают решающее значение для преодоления бактериями абиотических стрессов (70-72).

Ризобии *S. meliloti* синтезируют полисахариды — капсульные полисахариды, экзополисахариды EPSI (сукциноглюкан) и EPSII (галактоглюкан), липополисахариды, а также циклические глюканы (36, 73-75). Гены, детерминирующие синтез полисахаридов (*exo-exp-lps*), сосредоточены преимущественно на второй мегаплазмиде, которая не содержит гены *nod-nif-fix*. Показано, что мутации по генам синтеза полисахаридов приводят к нарушению микробно-растительного взаимодействия уже на ранних этапах, в результате чего не происходит образования клубеньков (58, 67, 74, 76). Вместе с тем мутации по некоторым из указанных выше групп генов (например, *exoB*, *exoY* или *lpsL*) могут, наоборот, усиливать клубенькообразование (77). У быстрорастущих ризобий сои *S. fredii* выявлен кластер генов, сходный с таковым у *S. meliloti*, который детерминирует синтез полисахаридов и тоже расположен на мегаплазмиде (16). Однако штаммы *S. fredii* не синтезируют экзополисахарид EPSII и не связывают лектин сои. Кроме того, бактерии этого вида более чувствительны к условиям засоления, менее подвижны и лучше адгезируются на небиотических поверхностях, чем бактерии *S. meliloti*.

Полисахариды брадиризобий связывают лектин сои, и для них характерно накопление полисахаридов в перибактероидном пространстве клубенька; эти полисахариды могут играть важную роль для выживания бактерий, не трансформировавшихся в бактериоиды и высвобождающихся из разрушающихся клубеньков в окружающую среду. У *B. japonicum* выявлен локус *lps*, включающий гены *rfaD*, *rfaF*, *lpcC* и *galE* (кодируют соответственно гептозоэпимеразу, гептозилтрансферазу, маннозилтрансферазу и глюкозоэпимеразу) и имеющий непосредственное отношение к процессам рецепции и клубенькообразования (78). Значительный интерес представляет ген *rfaL* (или *waaL*), продукт которого является ключевым ферментом биосинтеза клеточной стенки у брадиризобий. Показано участие продукта этого гена в формировании у ризобий устойчивости к различным видам

стрессов, а также к защитным механизмам со стороны растения в процессе инокуляции (78).

Немалую роль играет способность ризобий утилизировать инозитол и его производные, которые широко распространены в экосистемах как источник углерода. Инозитол входит в состав растительной клеточной стенки, представляет собой основную форму хранения фосфора в семенах, а также может быть сигнальной молекулой (79). Производные инозитола интересны тем, что имеют терапевтический эффект при лечении диабета и болезни Альцгеймера. У сино- и брадиризобий выявлены протяженные кластеры *iol* генов, но наиболее хорошо изучен *idhA* ген у *S. fredii*. У *S. fredii* активность этого гена взаимосвязана с формированием азотфиксирующих клубеньков, а у *S. meliloti* — с конкурентоспособностью штаммов (79).

Среди генов, имеющих отношение к фитнесу брадиризобий, особое место занимает *nosZ*. Показано, что мутанты *B. japonicum* по гену *nosZ* обладают повышенной активностью  $N_2O$ -редуктазы (восстанавливает  $N_2O$  в  $N_2$ ) и сохраняют способность формировать высокоэффективный азотфиксирующий симбиоз с соей (80, 81). Применение биоудобрений под посевы сои на основе природных штаммов, несущих измененный ген *nosZ*, по мнению авторов, может способствовать снижению выброса оксида азота (парниковый газ) в атмосферу (82). Также высказано мнение, что аллельный полиморфизм генов *hup* (накопление водорода), *nar* (периплазматическая нитратредуктаза), *nos* (нитритредуктаза) может быть использован для поиска природных эффективных симбионтов сои (7, 81, 82).

Непосредственное отношение к фитнесу бактерий имеют так называемые системы кворум сенсинга (quorum sensing, QS). Они выявлены практически у всех известных видов бактерий и функционируют как глобальные факторы регуляции, которые также могут быть задействованы в координирующем взаимодействии про- и эукариот. В процессе роста популяции и по достижению ее определенной плотности происходит синхронный синтез, накопление и секреция клетками химического сигнала — соединения, получившего название ацетилированный лактон гомосерина (acylated homoserine lactones, AHLs) (83). У *S. meliloti* выявлено несколько систем QS, одна из которых — *sinR/sinI* ответственна за синтез гомосеринлактонов, регулирующих синтез EPSII. Мутанты по *sin* гену формировали азотфиксирующие клубеньки на корнях *M. sativa* в значительно меньшем количестве и существенно позднее. Система QS у *S. fredii* играет важную роль при формировании биопленки на корнях *Glycine max*. По-видимому, аналогичная система также имеется у *B. japonicum*, но она существенно отличается от описанных выше, а также выявленных у других видов ризобий. Показано, что при высокой плотности брадиризобий вирулентность, наоборот, снижается, что обусловлено выработкой брадиоксетина (bradyoxetin) — соединения, имеющего структурное сходство с некоторыми антибиотиками и сидерофорами (70). Для брадиризобий установлен факт подавления активности *nod* генов при высокой плотности клеток и наличии флавоноидов; в процессе также участвуют гены *nodD2* и *nolA* (84), рассмотренные выше. Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют в пользу того, что QS системы крайне разнообразны и имеют разные механизмы регуляции, однако изучение их роли в микробно-растительных взаимоотношениях находится фактически на начальном этапе.

Подводя итог, прежде всего следует отметить, что сведения по основным группам симбиотически значимых генов клубеньковых бактерий все еще ограничены, фрагментарны и трудно сопоставимы не только для разных родов и видов, но даже для штаммов одного вида. Имеющиеся

данные подтверждают тот факт, что для каждого из контрастно различающихся по генетическим и фенотипическим показателям видов клубеньковых бактерий необходим анализ видо- и штаммоспецифичных генов (последовательностей), например гена 16S рРНК и групп *sym* генов (гены *nod*, *fix*, *eff*), *srg* и *QS*), активность которых сопряжена с формированием симбиоза и способностью противостоять абиотическим стрессорам. Подтверждение стабильного наследования аллелей *sym-srg-QS* генов, ответственных за образование высокоэффективных и стрессоустойчивых растительно-микробных симбиотических систем и/или вовлеченных в их формирование, повысит вероятность сохранения штаммом симбиотически значимых свойств в процессе хранения в лабораторных условиях, а также может быть применено для мониторинга штамма в микробиоме агроценоза. И наоборот, выявление структурных модификаций, например по паттернам сайтов рестрикции (профили ПЦР-ПДРФ; ПДРФ, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, RFLP, restriction fragment length polymorphism) для одного или нескольких указанных генов-кандидатов будет свидетельствовать о возможном изменении либо утрате штаммом соответствующих свойств. Сопряженный анализ последовательностей генов интереса из функционально различных групп генов, вовлеченных в формирование высокоэффективных стрессоустойчивых симбиозов, может быть использован при разработке генетических маркеров для SNP (single nucleotide polymorphism) технологии, адаптированной для гаплоидных геномов (85). Внедрение таких маркеров в современные молекулярно-генетические исследования по симбиогеномике обусловит переход к этапу направленного эффективного конструирования высокопродуктивных азотфиксирующих растительно-микробных систем с широким адаптивным потенциалом для органического сельского хозяйства в разных географических районах России.

Итак, оценка стабильного наследования аллелей генов, ответственных за образование высокоэффективных и стрессоустойчивых симбиотических систем клубеньковых бактерий с бобовым растением-хозяином, позволит еще на стадии хранения штамма в лабораторных условиях провести экспресс-тестирование симбиотически значимых и адаптивных свойств ризобий и разработать рекомендации по сохранению их жизнеспособности и генетической стабильности в биопрепаратах и микробиомах агроценозов.

ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной  
микробиологии,  
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,  
e-mail: mroumiantseva@yandex.ru

Поступила в редакцию  
31 июля 2019 года

*Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2019, V. 54, № 5, pp. 847-862

## ROOT NODULE BACTERIA: PERSPECTIVES OF MONITORING SYMBIOTIC PROPERTIES BY APPLYING GENETIC MARKERS

(review)

*M.L. Roumiantseva*

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia,  
e-mail mroumiantseva@yandex.ru

ORCID:

Roumiantseva M.L. [orcid.org/0000-0001-5582-6473](https://orcid.org/0000-0001-5582-6473)

The author declares no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 14.607.21.0178, RFMEFI60717X0178)

Received July 31, 2019

doi: 10.15389/agrobiolgy.2019.5.847eng

## Abstract

Alfalfa and soybeans are widely cultivated economically valuable fodder and leguminous crops the yield of which directly depends on bacterial microsymbionts. Processing seeds of legumes with strains of nodule bacteria (rhizobia) helps to increase the productivity of the plant-microbial system both in typical and in adverse growing conditions, for example, on degraded soils, including those subjected to salinization, waterlogging, aridity, etc. That is why obtaining new strains capable of forming highly productive and stress-resistant symbiotic systems with leguminous plants is extremely popular in agriculture. Modern technologies for the production of highly productive and environmentally differentiated varieties of legumes suggest the use of a biogeocenotic approach based on the consideration of symbiotrophic indicators (Z.S. Shamsutdinov, 2014). The formation of highly productive plant-microbial systems is based on the principle of complementarity of macro- and micro-symbiont genomes (I.A. Tikhonovich et al., 2015), the complementarity of the interaction of which determines their successful introduction into agrocenoses, which differ in agroclimatic and soil conditions. Virulence, competitiveness, specificity and effectiveness of nitrogen-fixing activity, which rhizobia exhibit in relation to a certain species, and sometimes to the variety of the leguminous host plant, are among the symbiotically significant and genetically determined properties of bacteria. All of the above symbiologically significant characteristics are determined by numerous groups of rhizobia genes. The review presents an analysis of data on the genes of soybean and alfalfa microsymbionts, for which participation in the control of symbiotic activity and stress resistance has been experimentally proven. Nodule bacteria of the species *Sinorhizobium meliloti*, *S. fredii*, and *Bradyrhizobium japonicum* are the most studied, but contrastingly differing in the genetic and morphophysiological characteristics. Analysis of recent data on the main groups of symbiologically significant genes (i.e. *nod* genes involved in the synthesis and decoration of the Nod factor signaling molecule which initiates the nodulation process during plant-microbial interaction, the *nif*, *fix*, and *eff* groups of genes responsible for the nitrogen fixation and symbiotic effectiveness) indicates a continuing high degree of incompleteness and fragmentation for both fast- and slow-growing rhizobia species. At the same time, according to published data, allelic polymorphism for these genes is a factor that plays an important role in varying signaling, host specificity, and symbiotic efficacy in both fast and slow-growing species of nodule bacteria. It is concluded that a coupled analysis of sequences of interest genes from functionally different groups of genes involved in the formation of highly effective stress-resistant symbioses, the *sym* genes (symbiosis), *srg* (stress related genes; genes of resistance to stress factors) and QS (quorum sensing genes), or *sym-srg*-QS genes, are promising for the search and creation of molecular markers associated with the symbiotic and adaptive properties of nodule bacteria necessary for monitoring them under laboratory conditions and in microbiome of agrocenosis.

Keywords: nodule bacteria, *Sinorhizobium meliloti*, *S. fredii*, *Bradyrhizobium japonicum*, alfalfa, soybean, genes of symbiotic activity, effectiveness, resistance to abiotic stresses.

## REFERENCES

1. Shamsutdinov Z.Sh. Forage crops selection: progress and challenges. *Agricultural Biology [Sel'skokhozyaistvennaya biologiya]*, 2014, 6: 36-45 (doi: 10.15389/agrobiol.2014.6.36eng).
2. Tikhonovich I.A., Andronov E.E., Borisov A.Yu., Dolgikh E.A., Zhernakov A.I., Zhukov V.A., Provorov N.A., Rumyantseva M.L., Simarov B.V. *Genetika*, 2015, 51(9): 973-990 (doi: 10.7868/S001667581509012X) (in Russ.).
3. Werner G.D.A., Cornwell W.K., Cornelissen J.H.C., Kiers E.T. Evolutionary signals of symbiotic persistence in the legume-rhizobia mutualism. *PNAS*, 2015, 112(33): 10262-10269 (doi: 10.1073/pnas.1424030112).
4. Rumyantseva M.L., Stepanova G.V., Muntyan V.S., Onishchuk O.P., Kozhemyakov A.P., Simarov B.V. V sbornike: *Aktual'nye napravleniya selektsii i ispol'zovaniya lyutserny v kormoproizvodstve*. Moscow, 2014: 133-142 (in Russ.).
5. Dragomir N., Peş I., Dragomir C.P.A., Toth S., Ravdan S. Enhancement of the capacity of biological nitrogen fixation in alfalfa by bacterial inoculation with *Sinorhizobium meliloti* strains. *Romanian Journal of Grassland and Forage Crops*, 2010, 1: 17-23.
6. Mabrouk Y., Belhadj O. Enhancing the biological nitrogen fixation of leguminous crops grown under stressed environments. (Review). *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11(48): 10809-10815 (doi: 10.5897/AJB10.2170).
7. O'Callaghan M. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(13): 5729-5746 (doi: 10.1007/s00253-016-7590-9).
8. Checcucci A., Diczio G.C., Bazzicalupo M., Mengoni A. Trade, diplomacy, and warfare: the quest for elite rhizobia inoculant strains. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2207 (doi: 10.3389/fmicb.2017.02207).
9. Meghvansi M.K., Prasad K., Mahna S.K. Symbiotic potential, competitiveness and compatibil-

- ity of indigenous *Bradyrhizobium japonicum* isolates to three soybean genotypes of two distinct agro-climatic regions of Rajasthan, India. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2010, 17(4): 303-310 (doi: 10.1016/j.sjbs.2010.06.002).
10. Umarov B.R. *Universum: Khimiya i biologiya: elektronnyi nauchnyi zhurnal*, 2019, 4(58): 1. Available <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/7083>. No date.
  11. Gibson A.H., Demezas D.H., Gault R.R., Bhuvaneshwari T.V., Brockwell J. Genetic stability in rhizobia in the field. *Plant and Soil*, 1990, 129(1): 37-44 (doi: 10.1007/BF00011689). (in Russ.).
  12. Aronshtam A.A., Bazhenova O.V., Zaretskaya A.N., Kuchko V.V., Novikova N.I., Provorov N.A., Fedorov S.N., Fokina I.G., Chernova T.A. *Geneticheskie metody selektsii klubenkovykh bakterii (metodicheskie rekomendatsii)* [Genetic methods for breeding nodule bacteria (guidelines)]. Leningrad, 1984 (in Russ.).
  13. Denton M., Yates R., Seymour N., Herridge D. Northern, southern and western regions. Harvesting the benefits of inoculating legumes. In: *Rhizobial inoculants FACT SHEET*. Grains Research and Developments Corporation, January 2013. Available <http://www.coretext.com.au>. Accessed 26.09.2019.
  14. Sachs J.L., Ehinger M.O., Simms E.L. Origins of cheating and loss of symbiosis in wild *Bradyrhizobium*. *Journal of Evolutionary Biology*, 2010, 23: 1075-1089 (doi: 10.1111/j.1420-9101.2010.01980).
  15. Tian C.F., Zhou Y.J., Zhang Y.M., Li Q.Q., Zhang Y.Z., Li D.F., Wang S., Wang J., Gilbert L.B., Li Y.R., Chen W.X. Comparative genomics of rhizobia nodulating soybean suggests extensive recruitment of lineage-specific genes in adaptations. *PNAS*, 2012, 109(22): 8629-8634 (doi: 10.1073/pnas.1120436109).
  16. Lopez-Baena F.J., Ruiz-Sainz J.E., Rodriguez-Carvajal M.A., Vinardell J.M. Bacterial molecular signals in the *Sinorhizobium fredii*-soybean symbiosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(5): 755 (doi: 10.3390/ijms17050755).
  17. Sachs J.L., Russell J.E., Hollowell A.C. Evolutionary instability of symbiotic function in *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS ONE*, 2011, 6(11): e26370 (doi: 10.1371/journal.pone.0026370).
  18. Batista J.S., Hungria M., Barcellos F.G., Ferreira M.C., Mendes I.C. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a cerrados soil. *Microbial Ecology*, 2007, 53(2): 270-284 (doi: 10.1007/s00248-006-9149-2).
  19. Kaneko T., Nakamura Y., Sato S., Minamisawa K., Uchiumi T., Sasamoto S., Watanabe A., Idesawa K., Iriguchi M., Kawashima K., Kohara M., Matsumoto M., Shimpo S., Tsuruoka H., Wada T., Yamada M., Tabata S. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Research*, 2002, 9(6): 189-197 (doi: 10.1093/dnares/9.6.225).
  20. Melchiorre M., de Luca M., Gonzalez A.G., Suarez P., Lopez C., Lascano R., Racca R.W. Evaluation of bradyrhizobia strains isolated from field-grown soybean plants in Argentina as improved inoculants. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 47(1): 81-89 (doi: 10.1007/s00374-010-0503-7).
  21. Gyogluu C., Jaiswal S.K., Kyei-Boahen S., Dakora F.D. Identification and distribution of microsymbionts associated with soybean nodulation in Mozambican soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 2018, 41(5): 506-515 (doi: 10.1016/j.syapm.2018.05.003).
  22. Chueire L.M.O., Hungria M. N<sub>2</sub>-fixation ability of Brazilian soybean cultivars with *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium xinjiangensis*. *Plant and Soil*, 1997, 196(1): 1-5 (doi: 10.1023/A:1004222218007).
  23. Hoque M.S., Broadhurst L.M., Thrall P.H. Genetic characterization of root-nodule bacteria associated with *Acacia salicina* and *A. stenophylla* (Mimosaceae) across south-eastern Australia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(2): 299-309 (doi: 10.1099/ijs.0.021014-0).
  24. Marinkovic J.B., Bjelic D.D., Tintor B.B., Ignjatov M.V., Nikolic Z.T., Dukic V.H., Balesevic-Tubic S.N. Molecular identification of *Bradyrhizobium japonicum* strains isolated from root nodules of soybean (*Glycine max* L.). *Zbornik Matice Srpske za Prirodne Nauke*, 2017, 132: 49-56 (doi: 10.2298/ZMSPN1732049M).
  25. Rumyantseva M.L., Muntyan V.S., Mengoni A., Simarov B.V. *Genetika*, 2014, 50(4): 400-412 (doi: 10.7868/S0016675814040109) (in Russ.).
  26. Tan Z., Hurek T., Vinuesa P., Muller P., Ladha J.K., Reinhold-Hurek B. Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(8): 3655-3664 (doi: 10.1128/AEM.67.8.3655-3664.2001).
  27. Zotov V.S., Punina N.V., Khapchaeva S.A., Didovich S.V., Mel'nichuk T.N., Topunov A.F. *Ekologicheskaya genetika*, 2012, 1(2): 50-63 (in Russ.).
  28. Cherni A.E., Perret X. Deletion of rRNA operons of *Sinorhizobium fredii* strain NGR234 and impact on symbiosis with legumes. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 154 (doi:

10.3389/fmicb.2019.00154).

29. Guo H.J., Wang E.T., Zhang X.X., Li Q.Q., Zhang Y.M., Tian C.F., Chena W.X. Replicon-dependent differentiation of symbiosis-related genes in *Sinorhizobium* strains nodulating *Glycine max*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 80(4): 1245-1255 (doi: 10.1128/AEM.03037-13).
30. Kanehara K., Minamisawa K. Complete genome sequence of *Bradyrhizobium japonicum* J5, isolated from a soybean nodule in Hokkaido, Japan. *Genome Announcements*, 2017, 5(6): e01619-16 (doi: 10.1128/genomeA.01619-16).
31. Itakura M., Saeki K., Omor I. H., Yokoyama T., Kaneko T., Tabata S., Ohwada T., Tajima S., Uchiumi T., Honnma K., Fujita K., Iwata H., Saeki Y., Hara Y., Ikeda S., Eda S., Mitsui H., Minamisawa K. Genomic comparison of *Bradyrhizobium japonicum* strains with different symbiotic nitrogen-fixing capabilities and other *Bradyrhizobiaceae* members. *The ISME Journal*, 2009, 3(3): 326-339 (doi: 10.1038/ismej.2008.88).
32. Muntyan V.S., Cherkasova M.E., Andronov E.E., Simarov B.V., Rumyantseva M.L. *Genetika*, 2016, 52(10): 1126-1133 (doi: 10.7868/S0016675816080105) (in Russ.).
33. Sullivan J.T., Patrick H.N., Lowther W.L., Scott D.B., Ronson C.W. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *PNAS*, 1995, 92(19): 8985-8989 (doi: 10.1073/pnas.92.19.8985).
34. Barcellos F.G., Menna P., da Silva Batista J.S., Hungria M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(8): 2635-2643 (doi: 10.1128/AEM.01823-06).
35. Kobayashi H., Broughton W.J. Fine-tuning of symbiotic genes in rhizobia: flavonoid signal transduction cascade. In: *Nitrogen-fixing leguminous symbioses. Nitrogen fixation: origins, applications, and research progress, vol. 7*. M.J. Dilworth, E.K. James, J.I. Sprent, W.E. Newton (eds.). Springer, Dordrecht, 2008: 117-152 (doi: 10.1007/978-1-4020-3548-7\_5).
36. Barnett M.J., Long S.R. The *Sinorhizobium meliloti* SyrM regulon: effects on global gene expression are mediated by *syrA* and *nodD3*. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197: 1792-1806 (doi: 10.1128/JB.02626-14).
37. Roche P., Maillat F., Plazanet C., Debelle F., Ferro M., Truchet G., Prome J.-C., Denarie J. The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *PNAS*, 1996, 93(26): 15305-15310 (doi: 10.1073/pnas.93.26.15305).
38. Capela D., Carrere S., Batut J. Transcriptome-based identification of the *Sinorhizobium meliloti* NodD1 regulon. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(8): 4910-4913 (doi: 10.1128/AEM.71.8.4910-4913.2005).
39. Shamseldin A. The role of different genes involved in symbiotic nitrogen fixation (review). *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 2013, 8(4): 84-94 (doi: 10.5829/idosi.gjbb.2013.8.4.82103).
40. Loh J., Stacey G. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 10-17 (doi: 10.1128/AEM.69.1.10-17.2003).
41. Pessi G., Ahrens C.H., Rehrauer H., Lindemann A., Hauser F., Fischer H.-M., Hennecke H. Genome-wide transcript analysis of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids in soybean root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20(11): 1353-1363 (doi: 10.1094/MPMI-20-11-1353).
42. Krause A., Doerfel A., Gottfert M. Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, 15(12): 1228-1235 (doi: 10.1094/MPMI.2002.15.12.1228).
43. Jimenez-Guerrero I., Perez-Montano F., Medina C., Ollero F.J., Lopez-Baena F.J. NopC is a rhizobium-specific type 3 secretion system effector secreted by *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103. *PLoS ONE*, 2015, 10(11): e0142866 (doi: 10.1371/journal.pone.0142866).
44. Zhao R., Liu X.L., Zhang Y.Z., Jiao J., Cui W.J., Zhang B., Wang X.L., Li M.L., Chen Y., Xiong Z.O., Chen W.X., Tian C.F. Adaptive evolution of rhizobial symbiotic compatibility mediated by co-evolved insertion sequences. *The ISME Journal*, 2018, 12(1): 101-111 (doi: 10.1038/ismej.2017.136).
45. Torres T.G., Del Papa M.F., Soria-Diaz M.E., Draghi W., Lozano M., Giusti M.L., Manyani H., Megias M., Serrano G.A., Puhler A., Niehaus K., Lagares A., Pistorio M. The nodulation of alfalfa by the acid-tolerant *Rhizobium* sp. strain LPU83 does not require sulfated forms of lipochitoooligosaccharide nodulation signals. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(1): 30-39 (doi: 10.1128/JB.01009-10.2011).
46. Lopez-Baena F.J., Ruiz-Sainz J.E., Rodriguez-Carvajal M.A., Vinardell J.M. Bacterial molecular signals in the *Sinorhizobium fredii*-soybean symbiosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(5): E755 (doi: 10.3390/ijms17050755).
47. Vinardell J.M., Acosta-Jurado S., Zehner S., Gottfert M., Becker A., Baena I., Blom J., Crespo-Rivas J.C., Goesmann A., Jaenicke S., Krol E., McIntosh M., Margaret I., Perez-Montano F., Schneiker-Bekel S., Serrania J., Szczepanowski R., Buendia A.M., Lloret J.,

- Bonilla I., Puhler A., Ruiz-Sainz J.-E., Weidner S. The *Sinorhizobium fredii* HH103 genome: a comparative analysis with *S. fredii* strains differing in their symbiotic behavior with soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2015, 28(7): 811-824 (doi: 10.1094/MPMI-12-14-0397-FI).
48. Rumyantseva M.L., Saksaganskaya A.S., Muntyan V.S., Cherkasova M.E., Simarov B.V. *Genetika*, 2018, 54(5): 524-534 (doi: 10.7868/S001667581805003X) (in Russ.).
  49. Saksaganskaya A.S., Muntyan V.S., Rumyantseva M.L. *Materialy Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii PLAMIC2018 «Rasteniya i mikroorganizmy: biotekhnologiya budushchego»* [Proc. Int. Conf. PLAMIC2018 «Plants and microorganisms: biotechnology of the future»]. Ufa, 2018: 222 (in Russ.).
  50. Debelle F., Moulin L., Mangin B., Denarie J., Boivin C. Nod genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Acta Biochimica Polonica*, 2001, 48(2): 359-365.
  51. Klipp W. Historical perspective — development of *nif* genetics and regulation in *Klebsiella pneumoniae*. In: *Genetics and regulation of nitrogen fixation in free-living bacteria*. W. Klipp, B. Masepohl, O.R. Gallon, W.E. Newton (eds.). Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, 2005: 1-25 (doi: 10.1007/1-4020-2179-8).
  52. Baimiev An.Kh., Ivanova E.S., Gumenko R.S., Chubukova O.V., Baimiev Al.Kh. *Genetika*, 2015, 51(12): 1359-1367 (doi: 10.7868/S001667581511003X) (in Russ.).
  53. Chang W.S., Franck W.L., Cytryn E., Jeong S., Joshi T., Emerich D.W., Sadowsky M.J., Xu D., Stacey G. An oligonucleotide microarray resource for transcriptional profiling of *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20(10): 1298-1307 (doi: 10.1094/MPMI-20-10-1298).
  54. Becker A., Berges H., Krol E., Bruand C., Ruberg S., Capela D., Lauber E., Meilhoc E., Ampe F., de Bruijn F.J., Fourment J., Francez-Charlot A., Kahn D., Kuster H., Liebe C., Puhler A., Weidner S., Batut J. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2004, 17(3): 292-303 (doi: 10.1094/MPMI.2004.17.3.292).
  55. Bueno E., Richardson D.J., Bedmar E.J., Delgado M.J. Expression of *Bradyrhizobium japonicum cbb3* terminal oxidase under denitrifying conditions is subjected to redox control. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 298(1): 20-28 (doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01711.x).
  56. Galperin M.Y., Makarova K.S., Wolf Y.I., Koonin E.V. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43: D261-269 (doi: 10.1093/nar/gku1223).
  57. Onishchuk O.P., Chizhevskaya E.P., Kurchak O.N., Andronov E.E., Simarov B.V. *Ekologicheskaya genetika*, 2014, 12(1): 39-47 (in Russ.).
  58. Onishchuk O.P., Sharypova L.A., Kurchak O.N., Bekker A., Simarov B.V. *Genetika*, 2005, 41(12): 1617-1623 (in Russ.).
  59. Yurgel S.N., Sharypova L.A., Simarov B.V., Soberon M., Miranda J., Morera C. Isolation of *Sinorhizobium meliloti* Tn5 mutants with altered cytochrome terminal oxidase expression and improved symbiotic performance. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 165(1): 167-173 (doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13142.x).
  60. Crespo-Rivas J.C., Navarro-Gomez P., Alias-Villegas C., Shi J., Zhen T., Niu Y., Cuellar V., Moreno J., Cubo T., Vinardell J.M., Ruiz-Sainz J.E., Acosta-Jurado S., Soto M.J. *Sinorhizobium fredii* HH103 RirA is required for oxidative stress resistance and efficient symbiosis with soybean. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(787): 1-16 (doi: 10.3390/ijms20030787).
  61. Onishchuk O.P., Kurchak O.N., Chizhevskaya E.P., Provorov N.A., Simarov B.V. Population polymorphism of the alfalfa nodule bacteria (*Sinorhizobium meliloti*) for the genes encoding for symbiotic efficiency and competitiveness. *Agricultural Biology [Sel'skokhozyaystvennaya biologiya]*, 2015, 50(3): 339-344 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.3.339eng).
  62. Deaker R., Roughley R.J., Kennedy I.R. Legume seed inoculation technology — a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004: 36(8): 1275-1288 (doi: 10.1016/j.soilbio.2004.04.009).
  63. Buntic A.V., Stajkovic-Srbnovic O.S., Knezevic M.M., Kuzmanovic D.Z., Rasulic N.V., Delic D.I. Development of liquid rhizobial inoculants and pre-inoculation of alfalfa seeds. *Archives of Biological Sciences*, 2018, 71 (doi: 10.2298/ABS181008062B).
  64. Vriezen J.A., de Bruijn F.J., Nüsslein K. Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(11): 3451-3459 (doi: 10.1128/AEM.02991-06).
  65. Rumyantseva M.L., Muntyan V.S. *Mikrobiologiya*, 2015, 84(3): 263-278 (doi: 10.7868/S0026365615030179) (in Russ.).
  66. Yakimenko M.V., Begun S.A., Sorokina A.I. *Vestnik DVO RAN*, 2019, 3: 36-41 (doi: 10.25808/08697698.2019.205.3.006) (in Russ.).
  67. Brechenmacher L., Lei Z., Libault M., Findley S., Sugawara M., Sadowsky M.J., Sumner L.W., Stacey G. Soybean metabolites regulated in root hairs in response to the symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiology*, 2010, 153(4): 1808-1822 (doi: 10.1104/pp.110.157800).

68. Gourion B., Sulser S., Frunzke J., Francez-Charlot A., Stiefel P., Pessi G., Vorholt J.A., Fischer H.M. The PhyR-EcfG signalling cascade is involved in stress response and symbiotic efficiency in *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Microbiology*, 2009, 73(2): 291-305 (doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06769.x).
69. Masloboeva N. Role of ECF factors in stress response of *Bradyrhizobium japonicum*. DISS. ETH No. 20849 (doi: 10.3929/ethz-a-007606640).
70. Gonzalez J.E., Marketon M.M. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67(4): 574-592 (doi: 10.1128/MMBR.67.4.574-592.2003).
71. Perez-Montano F., Jimenez-Guerrero I., Sanchez-Matamoros R.C., Perez-Montano F., Jimenez-Guerrero I., Rodriguez-Carvajal M.A., Belogin R.A., Espuny M.R. Rice and bean AHL-mimic quorum-sensing signals specifically interfere with the capacity to form biofilms by plant-associated bacteria. *Research in Microbiology*, 2013, 164(7): 749-760 (doi: 10.1016/j.resmic.2013.04.001).
72. Perez-Montano F., Jimenez-Guerrero I., Del Cerro P., Baena-Ropero I., Lopez-Baena I.J., Ollero F.J., Belloin R., Lloret J., Espuny R. The symbiotic biofilm of *Sinorhizobium fredii* SMH12, necessary for successful colonization and symbiosis of *Glycine max* cv Osumi, is regulated by quorum sensing systems and inducing flavonoids via NodD1. *PLoS ONE*, 2014, 9(8): e105901 (doi: 10.1371/journal.pone.0105901).
73. Limoli D.H., Jones C.J., Wozniak D.J. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiology Spectrum*, 2015, 3(3): MB-0011-2014 (doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014).
74. Bazaka K., Crawford R.J., Nazarenko E.L., Ivanova E.P. Bacterial extracellular polysaccharides. In: *Bacterial adhesion. Advances in experimental medicine and biology*, vol. 715. D. Linke, A. Goldman (eds.). Springer, Dordrecht, 2011: 213-226 (doi: 10.1007/978-94-007-0940-9\_13).
75. Mendis H.C., Madzima T.F., Queiroux C., Jones K.M. Function of succinoglycan polysaccharide in *Sinorhizobium meliloti* host plant invasion depends on succinylation, not molecular weight. *mBio*, 2016 7(3): e00606-16 (doi: 10.1128/mBio.00606-16).
76. Janczarek M. Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12(11): 7898-7933 (doi: 10.3390/ijms12117898).
77. Marczak M., Mazur A., Koper P., Żebrack I.K., Skorupska A. Synthesis of rhizobial exopolysaccharides and their importance for symbiosis with legume plants. *Genes*, 2017, 8(12): E360 (doi: 10.3390/genes8120360).
78. Noh J.G., Jeon H.E., So J.S., Chang W.S. Effects of the *Bradyrhizobium japonicum* *waaL* (*rfaL*) gene on hydrophobicity, motility, stress tolerance, and symbiotic relationship with soybeans. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(8): 16778-16791 (doi: 10.3390/ijms160816778).
79. Yoshida K., Kim W.-S., Kinehara M., Mukai R., Ashida H., Ikeda H., Fujita Y., Krishnan H.B. Identification of a functional 2-keto-myo-inositol dehydratase gene of *Sinorhizobium fredii* USDA191 required for myo-inositol utilization. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2006, 70(12): 2957-2964 (doi: 10.1271/bbb.60362).
80. Sanchez S., Itakura M., Mitsui H., Minamisawa K. Linked expressions of *nap* and *nos* genes in a *Bradyrhizobium japonicum* mutant with increased N<sub>2</sub>O reductase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(13): 4178-4180 (doi: 10.1128/AEM.00703-13).
81. Bueno E., Mesa S., Sanchez C., Bedmar E.J., Delgado M.J. NifA is required for maximal expression of denitrification genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(2): 393-400 (doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02076.x).
82. Itakura M., Tabata K., Eda S., Mitsui H., Murakami K., Yasuda J., Minamisawa K. Generation of *Bradyrhizobium japonicum* mutants with increased N<sub>2</sub>O reductase activity by selection after introduction of a mutated *dnaQ* gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(23): 7258-7264 (doi: 10.1128/AEM.01850-08).
83. Khmel' I.A., Belik A.S., Zaitseva Yu.V., Danilova N.N. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16: Biologiya*, 2008, 1: 28-35 (in Russ.).
84. Bogino P.C., Nievas F.L., Giordano W. A review: quorum sensing in *Bradyrhizobium*. *Applied Soil Ecology*, 2015, 94: 49-58 (doi: 10.1016/j.apsoil.2015.04.016).
85. Beerenwinkel N., Gunthard H.F., Roth V., Metzner K.J. Challenging and opportunities in estimating viral genetic diversity from next generating sequencing data. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 329 (doi: 10.3389/fmicb.2012.00329).