

<https://doi.org/10.17816/ecogen17143-51>

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОСИМБИОНТОВ ТЕРМОПСИСА ЛАНЦЕТНОГО (*THERMOPSIS LANCEOLATA*), ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО В МОНГОЛИИ

© Д.С. Карлов<sup>1</sup>, А.Л. Сазанова<sup>1</sup>, И.Г. Кузнецова<sup>1</sup>, В.И. Сафронова<sup>1</sup>, Н.Ю. Тихомирова<sup>1</sup>, Ж.П. Попова<sup>1</sup>, Ю.С. Оследкин<sup>1</sup>, А.В. Верхожина<sup>2</sup>, А.А. Белимов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург;

<sup>2</sup> ФГБУН «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» СО РАН, Иркутск

Для цитирования: Карлов Д.С., Сазанова А.Л., Кузнецова И.Г., и др. Генетическое разнообразие микросимбионтов термопсиса ланцетного (*Thermopsis lanceolata*), произрастающего в Монголии // Экологическая генетика. — 2019. — Т. 17. — № 1. — С. 43–51. <https://doi.org/10.17816/ecogen17143-51>.

Поступила: 13.10.2018

Одобрена: 04.12.2018

Принята: 25.03.2019

✿ Впервые были выделены и идентифицированы бактерии из клубеньков дикорастущего лекарственного бобового растения термопсиса ланцетного (*Thermopsis lanceolata*), произрастающего в Монголии. В результате секвенирования 16S рДНК (*rrs*) и гена «домашнего хозяйства» *atpD* определено таксономическое положение 14 изолятов. Показано значительное биоразнообразие микросимбионтов термопсиса, которые относились к трем родам порядка *Rhizobiales*: *Phyllobacterium* (сем. *Phyllobacteriaceae*), *Rhizobium* (сем. *Rhizobiaceae*) и *Bosea* (сем. *Bradyrhizobiaceae*). Видовая принадлежность была определена для девяти изолятов: шесть изолятов были идентифицированы как *Phyllobacterium zundukense* и *Phyllobacterium trifolii* (100 и 99,9 % *rrs* гомологии с типовыми штаммами *P. zundukense* Tri-48<sup>T</sup> и *P. trifolii* PETP02<sup>T</sup> соответственно), три изолята — как *Rhizobium anhuiense* (99,8 % *rrs* гомологии с типовым штаммом *R. anhuiense* CCBAU 23252<sup>T</sup>). Два медленно растущих изолята Tla-534 и Tla-545, отнесенных к роду *Bosea*, могут потенциально принадлежать к новым видам, поскольку их сходство по гену *rrs* с ближайшими типовыми штаммами *B. massiliensis* LMG 26221<sup>T</sup>, *B. lathyri* LMG 26379<sup>T</sup> и *B. vaviloviae* Vaf18<sup>T</sup> составляло 98,5–99,0 %. Неризобияльных штаммов из клубеньков выделено не было. Создание коллекции микросимбионтов термопсиса ланцетного и их изучение является одной из необходимых предпосылок для промышленного возделывания этой ценной лекарственной культуры.

✿ **Ключевые слова:** лекарственные бобовые растения; термопсис ланцетный *Thermopsis lanceolata*; клубеньковые бактерии; гены 16S рДНК и *atpD*.

## THE GENETIC DIVERSITY OF MICROSymbionTS FROM *THERMOPSIS LANCEOLATA* GROWING IN MONGOLIA

© D.S. Karlov<sup>1</sup>, A.L. Sazanova<sup>1</sup>, I.G. Kuznetsova<sup>1</sup>, V.I. Safronova<sup>1</sup>, N.Y. Tikhomirova<sup>1</sup>, Zh.P. Popova<sup>1</sup>, Yu.S. Osledkin<sup>1</sup>, A.V. Verkhovina<sup>2</sup>, A.A. Belimov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia;

<sup>2</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry (SIPPB), Irkutsk, Russia

For citation: Karlov DS, Sazanova AL, Kuznetsova IG, et al. The genetic diversity of microsymbionts from *Thermopsis lanceolata* growing in Mongolia. *Ecological genetics*. 2019;17(1):43-51. <https://doi.org/10.17816/ecogen17143-51>.

Received: 13.10.2018

Revised: 04.12.2018

Accepted: 25.03.2019

✿ For the first time, bacteria were isolated and identified from the root nodules of a wild-growing medicinal legume plant *Thermopsis lanceolata*, originated from Mongolia. The taxonomic position of 14 isolates obtained was determined using of sequencing of the 16S rRNA (*rrs*) and *atpD* genes. It was shown a significant biodiversity of the isolates from *T. lanceolata*, which belonged to three genera of the order *Rhizobiales*: *Phyllobacterium* (family *Phyllobacteriaceae*), *Rhizobium* (family *Rhizobiaceae*) and *Bosea* (family *Bradyrhizobiaceae*). Six isolates belonged to the species *Phyllobacterium zundukense* and *Phyllobacterium trifolii* (100 and 99,9% *rrs* similarity with the type strains *P. zundukense* Tri-48<sup>T</sup> and *P. trifolii* PETP02<sup>T</sup>, respectively), three isolates were identified as *Rhizobium anhuiense* (99,8% *rrs* similarity with the type strain *R. anhuiense* CCBAU 23252<sup>T</sup>). Two slow-growing isolates of the genus *Bosea* Tla-534 and Tla-545 may potentially belong to new species, since their *rrs*-similarity to the closest type strains *B. massiliensis* LMG 26221<sup>T</sup>, *B. lathyri* LMG 26379<sup>T</sup> and *B. vaviloviae* Vaf18<sup>T</sup> was 98,5-99,0%. Non-rhizobial strains were not isolated. The isolation and future investigation of the rhizobial microsymbionts of the valuable medicinal legume *Thermopsis lanceolata* is one of the necessary prerequisites for its industrial cultivation.

✿ **Keywords:** medicinal legume plants; *Thermopsis lanceolata*; root nodule bacteria; 16S rRNA and *atpD* genes.

Бобово-ризобияльный симбиоз — уникальное и широко распространенное явление среди бобовых растений. Клубеньковые бактерии (ризобии), как неотъемлемая

часть такого симбиоза, служат объектом пристального изучения при создании коллекций и выявлении механизмов растительно-микробных взаимодействий. Известно,

что бобовые растения, обладая высоким морфофизиологическим и экологическим разнообразием, вносят решающий вклад в азотный баланс многих наземных экосистем и агроценозов. Такая возможность достигается за счет расширения биохимических функций у обоих симбиотических партнеров и приобретения растениями новых адаптивных способностей [1]. В связи с этим изучение бобово-ризобияльного симбиоза имеет огромное экологическое и практическое значение.

Термопсис ланцетный (*Thermopsis lanceolata*, R.Br.) — многолетнее дикорастущее бобовое растение, встречающееся в Западной и Восточной Сибири, Байкальском регионе, Средней Азии, на севере Монголии и Китая [2]. Растение содержит ряд алкалоидов и обладает ценными фармакологическими свойствами. Одним из главных биологически активных алкалоидов является цитизин, содержащийся преимущественно в семенах [3] и применяющийся в медицинских целях для лечения никотиновой зависимости (препарат Табекс) [4], а также в качестве отхаркивающего средства (препараты Термопсол и Коделак Бронхо); широко используется в ветеринарии (препарат Цититон) [5]. О попытках выделения клубеньковых бактерий из *T. lanceolata* в литературных источниках не упоминается. Вместе с тем для эффективного введения в культуру этого растения (особенно в условиях интродукции) необходимо создание коллекции его микросимбионтов с целью производства на их основе ростостимулирующих биопрепаратов. При этом на первом этапе исследования штаммов-микросимбионтов необходимо проведение их идентификации с использованием современных молекулярно-генетических методов, таких как секвенирование последовательности 16S рДНК и генов «домашнего хозяйства».

Таким образом, цель нашей работы состояла в создании коллекции ризобияльных микросимбионтов дикорастущего лекарственного бобового растения *T. lanceolata*, произрастающего в Северной Монголии, и определении таксономического положения штаммов с помощью секвенирования последовательностей 16S рДНК и гена «домашнего хозяйства» *atpD*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были 14 бактериальных изолятов, выделенных по стандартной методике [6] из корневых клубеньков бобового растения *T. lanceolata*, собранного в горно-таежной области Монголии (окрестности озера Хубсугул, правый берег реки Эгийн-Гол, пос. Алаг-Эрденэ). Бактерии выращивали на модифицированном маннитно-дрожжевом агаре YMSA с добавлением 0,5 % сукцината [7]. Из каждого клубенька было отобрано по одному изоляту. Видовую принадлежность изолятов определяли с помощью амплификации и секвенирования гена 16S рРНК, как было описано ранее [7]. Для уточнения

таксономического положения изолятов использовали амплификацию и секвенирование гена *atpD*, кодирующего  $\beta$ -субъединицу АТФ-синтазного комплекса, с применением праймеров *atpD*-273F/*atpD*-771R [8] и *atpD*352F/*atpD*871R [9]. Полученный ПЦП-продукт выделяли из геля и очищали, как было описано ранее [10], для последующего секвенирования на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xl (Applied Biosystems, США). Поиск гомологичных последовательностей проводили с помощью базы данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для конструирования филогенетических деревьев использовали программу MEGA7 и метод Neighbor-Joining [11]. Нуклеотидные последовательности, полученные в работе, депонированы в базе данных GenBank под номерами MN779890–MN779903, MK135051–MK135064.

Все полученные изоляты депонированы в Водостанционной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) и размещены на Станции низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов (Liconic Instruments, Лихтенштейн) [12]. Информация об изолятах доступна в интернет-базе данных ВКСМ (<http://www.arriam.spb.ru>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В окрестностях озера Хубсугул, где был проведен отбор растений для последующего выделения бактерий из корневых клубеньков, климат резко континентальный и почвы функционируют в условиях криодизации и аридизации [13]. Почву непосредственно в месте отбора можно охарактеризовать как литозем серогумусовый [14], реакция почв кислая или нейтральная [15]. В результате анализа клубеньков, собранных с разных растений *T. lanceolata* одной популяции, было выделено 14 бактериальных изолятов: два из них формировали колонии на 5–6-е сутки, три — на 3-и сутки и девять — на 4–5-е сутки.

Анализ последовательностей гена 16S рРНК (*rrs*) позволил отнести полученные изоляты к трем родам порядка *Rhizobiales*: *Phyllobacterium* (сем. *Phyllobacteriaceae*), *Rhizobium* (сем. *Rhizobiaceae*) и *Bosea* (сем. *Bradyrhizobiaceae*). На рис. 1 показано, что штаммы, относящиеся к родам *Phyllobacterium* и *Rhizobium*, формируют две обособленные группы. Штаммы *Phyllobacterium*, в свою очередь, разделились на три кластера. В *Rrs*-кластер I вошли изоляты П1а-531, П1а-536, П1а-538, П1а-546 и П1а-549, а также типовые штаммы *P. trifolii* РЕТР02<sup>T</sup> и *P. loti* S658<sup>T</sup> при уровне поддержки 100 % (см. рис. 1). Сходство изолятов по гену *rrs* с указанными типовыми штаммами составляло 99,9 и 100 % соответственно, при этом последовательности гена у изолятов были идентичны (табл. 1). Однако на филогенетическом древе,

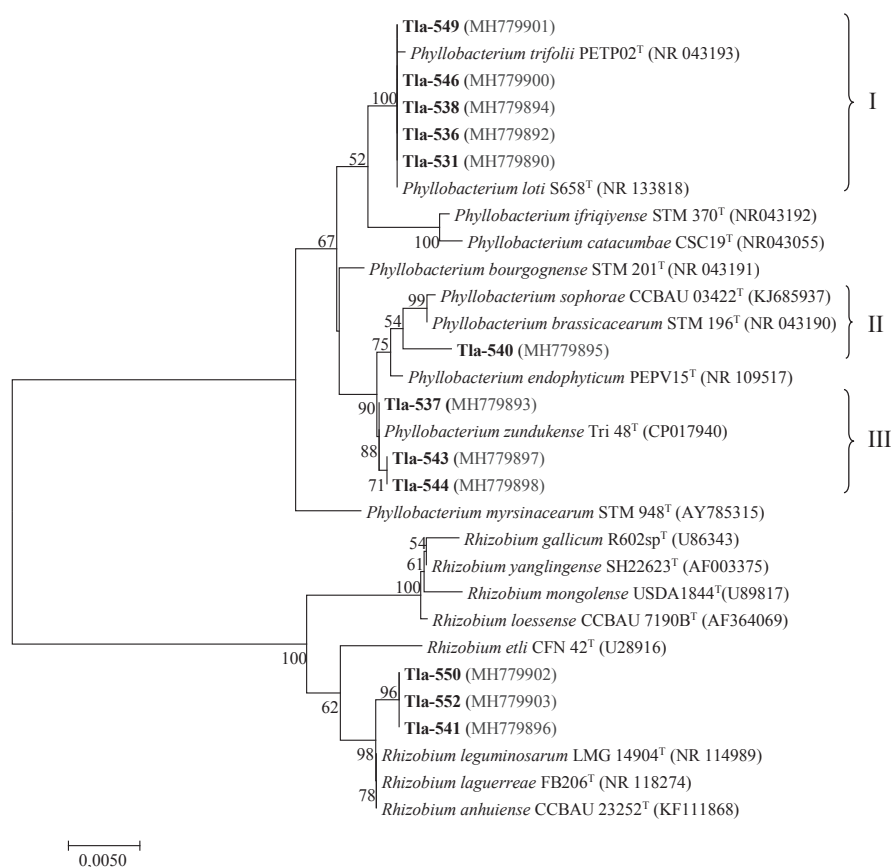


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рPHК изолятов, выделенных из клубеньков термопсиса ланцетного (*Thermopsis lanceolata*), а также представителей родственных видов *Phyllobacterium* и *Rhizobium*. Полученные изоляты обозначены жирным шрифтом. Типовые штаммы отмечены литерой Т. Кластеры I–III сформированы с участием изолятов *Phyllobacterium*, полученных в работе. Указаны уровни поддержки более 50 %

Таблица 1

**Гомология генов 16S рPHК и *atpD* у изолятов, выделенных из клубеньков *Thermopsis lanceolata*, и типовых штаммов ближайших видов *Phyllobacterium***

Типовые штаммы	Локус	Уровень гомологии с изолятами (%)								
		Кластер I					Кластер II	Кластер III		
		Tla-531	Tla-536	Tla-538	Tla-546	Tla-549	Tla-540	Tla-537	Tla-543	Tla-544
<i>P. trifolii</i> PETP02 <sup>T</sup>	16S рPHК	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	98,3	98,9	98,9	98,9
	<i>atpD</i>	100	93,3	93,4	100	100	89,5	89,0	89,0	89,0
<i>P. loti</i> S658 <sup>T</sup>	16S рPHК	100	100	100	100	100	98,4	99,0	99,0	99,0
	<i>atpD</i>	96,7	92,6	92,6	96,7	96,7	89,3	87,7	87,7	87,7
<i>P. bourgognense</i> STM 201 <sup>T</sup>	16S рPHК	99,1	99,1	99,2	99,2	99,2	98,8	99,4	99,3	99,3
	<i>atpD</i>	88,9	89,6	89,6	88,9	88,9	89,6	91,8	91,8	91,8
<i>P. brassicacearum</i> STM 196 <sup>T</sup>	16S рPHК	98,7	98,7	98,7	98,7	98,7	99,3	99,3	99,3	99,3
	<i>atpD</i>	96,9	94,2	94,2	96,9	96,9	88,9	87,9	87,9	87,9
<i>P. endophyticum</i> PEPV15 <sup>T</sup>	16S рPHК	98,1	98,1	98,7	98,7	98,7	99,2	99,5	99,4	99,4
	<i>atpD</i>	90,8	90,8	90,1	90,8	90,8	89,8	89,6	89,6	89,6
<i>P. zundukense</i> Tri-48 <sup>T</sup>	16S рPHК	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0	99,3	100	99,9	99,9
	<i>atpD</i>	89,0	89,8	89,8	89,0	89,0	89,3	100	100	100
<i>P. sophorae</i> CCBAU03422 <sup>T</sup>	16S рPHК	98,3	98,3	98,5	98,5	98,5	99,1	99,0	99,2	99,2
	<i>atpD</i>	88,9	89,4	89,4	88,9	88,9	87,3	91,5	91,5	91,5

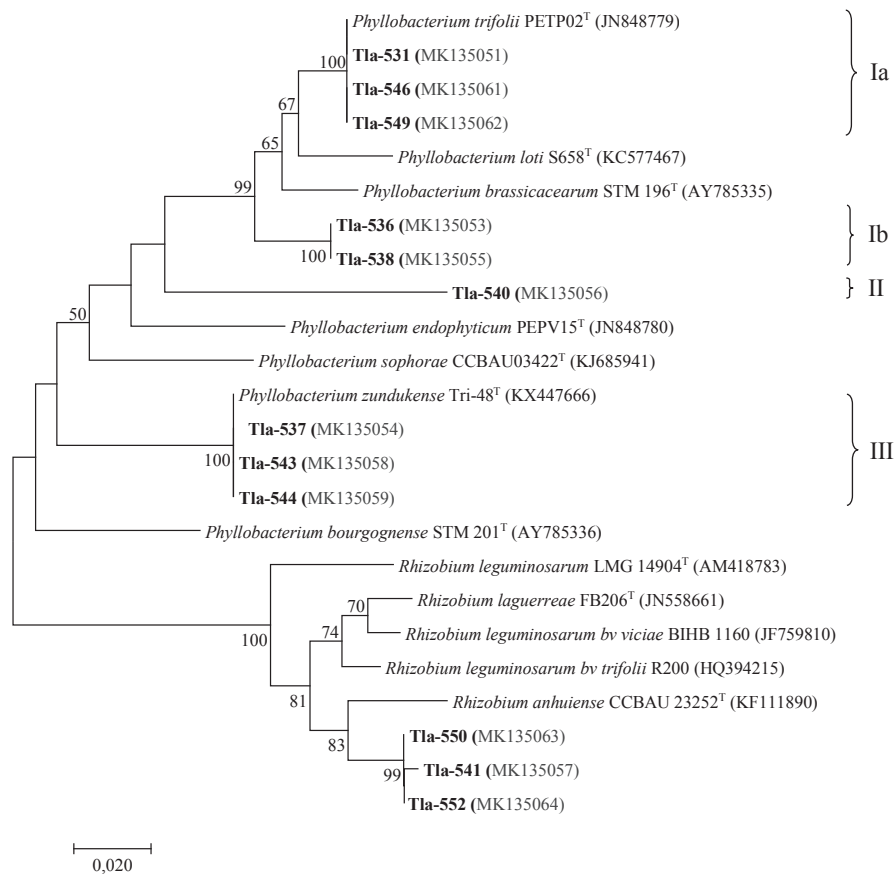


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов *atpD* изолятов, выделенных из клубеньков термопсиса ланцетного (*Thermopsis lanceolata*), а также представителей родственных видов *Phyllobacterium* и *Rhizobium*. Полученные изоляты обозначены жирным шрифтом. Типовые штаммы отмечены литерой Т. Кластеры Ia, Ib, II и III сформированы с участием изолятов, полученных в работе. Указаны уровни поддержки более 50 %

построенном на основании анализа гена *atpD*, данные изоляты разделились на два статистически достоверных кластера (рис. 2). Кластер Ia формировался при 100 % уровне поддержки и состоял из изолятов Tla-531, Tla-546, Tla-549, а также типового штамма *P. trifolii* PETP02<sup>T</sup>, сходство с которым по гену *atpD* составляло 100 % (см. табл. 1). Таким образом, на основании результатов секвенирования гена *atpD* изоляты Tla-531, Tla-546, Tla-549 были идентифицированы как *P. trifolii*. Отметим, что бактерии этого вида впервые были выделены из клубеньков клевера лугового (*Trifolium pretense*) [16]. Ранее было показано, что штамм *P. trifolii* PETP02<sup>T</sup> способен вступать в эффективный симбиоз с растениями *Trifolium repens* и *Lupinus albus* [16, 17]. Помимо этого, бактерии, близкородственные виду *P. trifolii* и имеющие 99,9 % сходства с ним по *rrs* гену, были выделены из клубеньков эспарцета виколистного (*Onobrychis viciifolia*) [18], что говорит о широком спектре растений-хозяев у этой группы ризобий. Кластер Ib был образован изоля-

тами Tla-536 и Tla-538, идентифицированными как *Phyllobacterium sp.* и наиболее близкими к видам *P. loti* и *P. trifolii* (см. рис. 1, 2; табл. 1).

*Rrs*-кластер II был сформирован при низком уровне поддержки 54 % штаммами *P. sophorae* CCBAU03422<sup>T</sup>, *P. brassicacearum* STM 196<sup>T</sup> и изолятом Tla-540, который на *atpD*-дендрограмме не группировался с другими штаммами (см. рис. 1, 2). Сходство этого изолята по *rrs*-гену с ближайшими видами *P. brassicacearum* и *P. zundukense* составляло 99,3 % (см. табл. 1). На основании анализа полученных данных изолят Tla-540 был идентифицирован как *Phyllobacterium sp.*

*Rrs*-кластер III объединил изоляты Tla-537, Tla-543, Tla-544 и типовой штамм *P. zundukense* Tri-48<sup>T</sup> при уровне поддержки 88 % (см. рис. 1). На *atpD*-дендрограмме (см. рис. 2) данные штаммы также образовали статистически достоверный кластер (уровень поддержки 100 %). С учетом высокой степени гомологии по генам *rrs* (99,9–100 %) и *atpD* (100 %) изоляты Tla-537, Tla-543, Tla-544 были идентифицированы как

Таблица 2

Гомология генов 16S рPHK и *atpD* у изолятов, выделенных из клубеньков *Thermopsis lanceolata*, и типовых штаммов ближайших видов *Bosea* и *Rhizobium*

Типовой штамм	Локус	Уровень гомологии с изолятами (%)		Типовой штамм	Локус	Уровень гомологии с изолятами (%)		
		Tla-534	Tla-545			Tla-541	Tla-550	Tla-552
<i>B. massiliensis</i> LMG 26221 <sup>T</sup>	16S рPHK	99,0	98,6	<i>R. leguminosarum</i> LMG 14904 <sup>T</sup>	16S рPHK	99,8	99,8	99,8
	<i>atpD</i>	92,4	95,6		<i>atpD</i>	93,5	93,7	93,7
<i>B. lathyri</i> LMG 26379 <sup>T</sup>	16S рPHK	99,0	98,5	<i>R. anhuiense</i> ССВАУ23252 <sup>T</sup>	16S рPHK	99,8	99,8	99,8
	<i>atpD</i>	91,9	94,0		<i>atpD</i>	96,8	97,0	97,0
<i>B. vaviloviae</i> Vaf18 <sup>T</sup>	16S рPHK	98,9	98,5	<i>R. laguerreae</i> FB206 <sup>T</sup>	16S рPHK	99,8	99,8	99,8
	<i>atpD</i>	91,0	92,2		<i>atpD</i>	95,7	95,9	95,9

вид *P. zundukense* (см. табл. 1), который был недавно описан для микросимбионтов реликтового бобового растения остролодочника трехлистного (*Oxytropis triphylla*), произрастающего в Прибайкальском регионе [19]. Было показано, что штаммы *P. zundukense*, выделенные из клубеньков *O. triphylla*, по всей видимости, самостоятельно не вступают в симбиоз, поскольку не имеют общих *nodABC* генов, необходимых для нодуляции растений [19]. В настоящее время род *Phyllobacterium* представлен всего 11 видами, большая часть которых выделена из корневых клубеньков бобовых [16, 19–23], однако только у двух видов (*P. trifolii* и *P. sophorae*) были обнаружены *nodACD* и *nifH* гены, необходимые для эффективного симбиоза с растением-хозяином. Известно, что *P. trifolii* и *P. sophorae* способны самостоятельно образовывать клубеньки на растении-хозяине [16, 23, 24].

Быстрорастущие изоляты Tla-541, Tla-550 и Tla-552 были отнесены к роду *Rhizobium* и показали одинаковый уровень *rrs*-гомологии (99,8 %) сразу с тремя типовыми штаммами *R. leguminosarum* LMG 14904<sup>T</sup>, *R. anhuiense* ССВАУ23252<sup>T</sup> и *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup>, с которыми формировали общий кластер при уровне поддержки 98 % (см. рис. 1, табл. 2). На *atpD*-дендрограмме изоляты Tla-541, Tla-550 и Tla-552 кластеризовались только с типовым штаммом *R. anhuiense* ССВАУ23252<sup>T</sup> при достаточно высоком уровне поддержки 83 % (см. рис. 2). Принимая во внимание значительное сходство гена *atpD* у штамма *R. anhuiense* ССВАУ23252<sup>T</sup> и изолятов Tla-541, Tla-550 и Tla-552 (96,8–97,0 %), последние были отнесены к виду *Rhizobium anhuiense* (см. табл. 2). Штаммы этого вида были выделены из клубеньков бобов обыкновенных (*Vicia faba*) и гороха посевного (*Pisum sativum*), произрастающих в Китае [25]. Бактерии *R. anhuiense* являются также микросимбионтами чины японской *Lathyrus japonicus* [26]. Было показано, что для *L. japonicus* ха-

рактерна очень высокая способность к азотфиксации, особенно в условиях низких температур арктического и субарктического регионов, где данное растение рассматривается в качестве перспективной кормовой культуры [27]. В целом род *Rhizobium* составляет наиболее представительную группу семейства *Rhizobiaceae*, все виды которой способны фиксировать атмосферный азот и образовывать устойчивые симбиозы с бобовыми растениями [28].

Медленнорастущие изоляты Tla-534 и Tla-545 не сформировали на *rrs*- и *atpD*-дендрограммах статистически достоверных групп с другими штаммами (рис. 3, 4). По уровню гомологии гена *rrs* (см. табл. 2) изоляты Tla-534 и Tla-545 показали наибольшее сходство с типовыми штаммами рода *Bosea*: *B. massiliensis* LMG 26221<sup>T</sup>, *B. lathyri* LMG 26379<sup>T</sup> и *B. vaviloviae* Vaf18<sup>T</sup> (сходство 98,5–99,0 %). Исходя из полученных данных, оба изолята были идентифицированы как *Bosea sp.* С учетом полученных результатов можно предположить, что изоляты Tla-534 и Tla-545 могут относиться к новым видам рода *Bosea*. Этот род представлен в настоящее время девятью видами, из которых только четыре вида (*B. lupini*, *B. lathyri*, *B. robiniae* и *B. vaviloviae*) были выделены из клубеньков бобовых растений родов *Lupinus*, *Lathyrus*, *Robinia* и *Vavilovia* соответственно. Однако способность этих штаммов к самостоятельному формированию симбиозов до сих пор не изучена [7, 29, 30].

Таким образом, в результате исследования мы впервые получили бактериальные изоляты из корневых клубеньков бобового растения *T. lanceolata*. Были идентифицированы клубеньковые бактерии видов *P. trifolii* и *R. anhuiense*, представители которых образуют клубеньки на растениях, а также бактерии вида *P. zundukense* с пока не изученной способностью к самостоятельному формированию симбиоза. Изоляты, отнесенные к роду *Bosea*, по-видимому, могут быть представителями новых видов медленнорастущих риз-

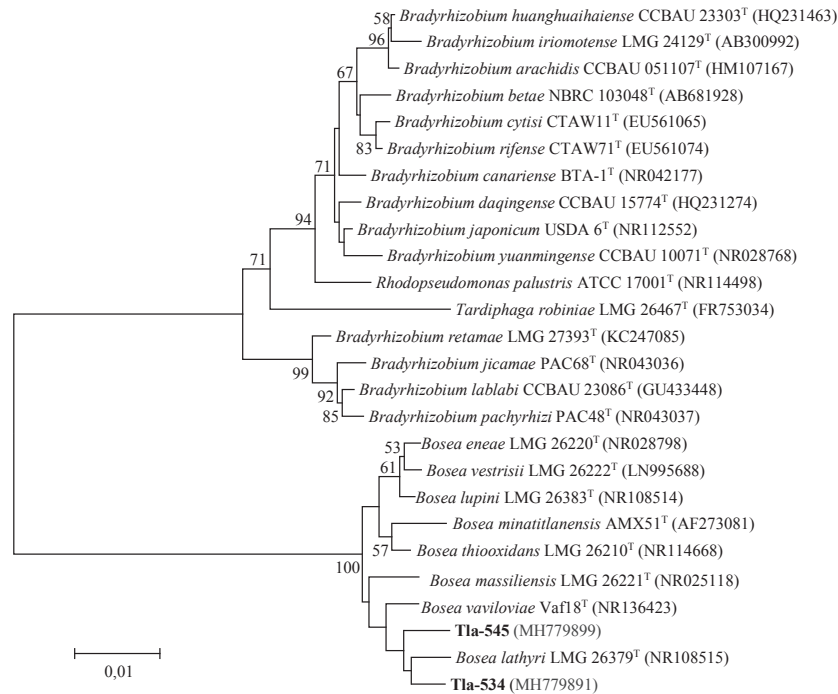


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК изолятов, выделенных из клубеньков термопсиса ланцетного (*Thermopsis lanceolata*), а также представителей родственных видов *Bosea*. Полученные изоляты обозначены жирным шрифтом. Типовые штаммы отмечены литерой Т. Указаны уровни поддержки более 50 %

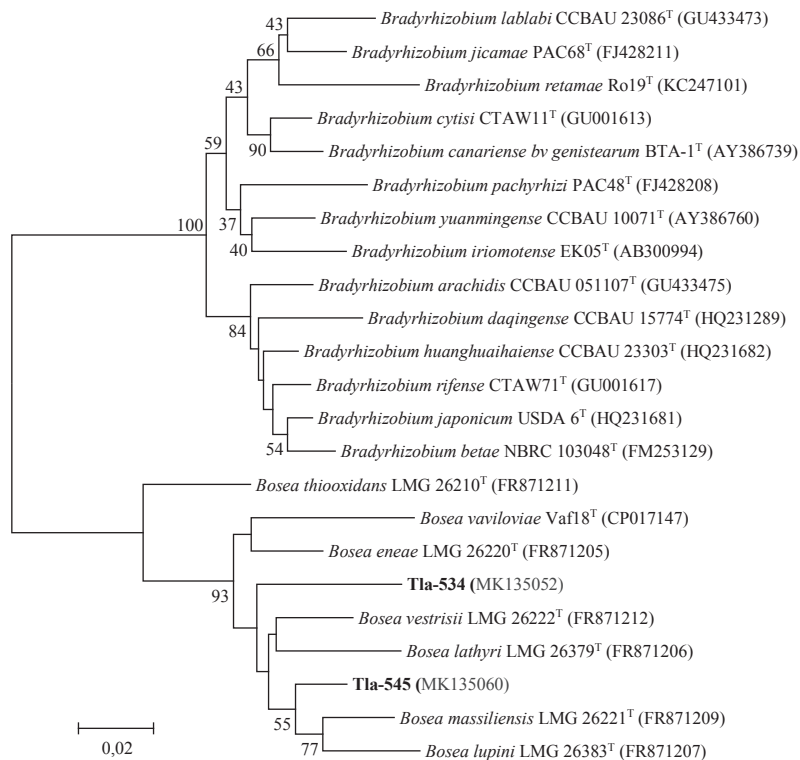


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов *atpD* изолятов, выделенных из клубеньков термопсиса ланцетного (*Thermopsis lanceolata*), а также представителей родственных видов *Bosea*. Полученные изоляты обозначены жирным шрифтом. Типовые штаммы отмечены литерой Т. Указаны уровни поддержки более 30 %

обий. Следует отметить, что для уточнения таксономического положения 9 из 14 полученных изолятов был успешно использован анализ гена *atpD*, благодаря которому нам удалось описать новые виды *P. zundukense* и *B. vaviloviae* [7, 19]. Создание и изучение коллекции микросимбионтов термопсиса ланцетного позволит в дальнейшем создать предпосылки для повышения эффективности промышленного возделывания этой ценной лекарственной культуры.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (тема № 0664-2018-0001). Секвенирование гена *atpD* проведено при поддержке РНФ (грант № 16-16-00080). Долгосрочное хранение штаммов осуществляется за счет средств, выделенных на Программу по развитию и инвентаризации биоресурсных коллекций научными организациями.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Генетические основы эволюции растительно-микробного симбиоза. — СПб.: Информ-Навигатор, 2012. [Provovrov NA, Vorob'ev NI. Geneticheskie osnovy evolyutsii rastitel'no-mikrobnogo simbioza. Saint Petersburg: Inform-Navigator; 2012. (In Russ.)]
- Мальцев А.И. Атлас важнейших видов сорных растений СССР. — М.; Ленинград: ОГИЗ Сельхозгиз, 1939. [Mal'tsev AI. Atlas vazhneyshikh vidov sornykh rasteniy SSSR. Moscow, Leningrad: OGIz Sel'khozgiz; 1939. (In Russ.)]
- Shakirov TT, Sabirov KA. The production of cyisine from the seeds of *Thermopsis lanceolata*. *Chem Nat Compd*. 1970;6(6):733-734. <https://doi.org/10.1007/BF00565346>.
- Tutka P, Zatonski W. Cytisine for the treatment of nicotine addiction: from a molecule to therapeutic efficacy. *Pharmacol Rep*. 2006;58(6):777-798.
- Рабинович М.И. Лекарственные растения в ветеринарной практике. — М.: Агропромиздат, 1987. [Rabinovich MI. Lekarstvennye rasteniya v veterinarnoy praktike. Moscow: Agropromizdat; 1987. (In Russ.)]
- Novikova N, Safronova V. Transconjugants of *Agrobacterium radiobacter* harbouring *sym* genes of *Rhizobium galegae* can form an effective symbiosis with *Medicago sativa*. *FEMS Microbiol Lett*. 1992;72(3):261-268. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05107.x>.
- Safronova VI, Kuznetsova IG, Sazanova AL, et al. *Bosea vaviloviae* sp. nov., a new species of slow-growing rhizobia isolated from nodules of the relict species *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2015;107(4):911-920. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0383-9>.
- Gaunt MW, Turner SL, Rigottier-Gois L, et al. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51(Pt 6):2037-2048. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2037>.
- Martens M, Dawyndt P, Coopman R, et al. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008;58(Pt 1):200-214. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65392-0>.
- Stepkowski T, Zak M, Moulin L, et al. *Bradyrhizobium canariense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the two dominant rhizobium species in root nodules of lupin and serradella plants growing in Europe. *Syst Appl Microbiol*. 2011;34(5):368-375. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.03.002>.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011;28(10):2731-9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>.
- Safronova V, Tikhonovich I. Automated cryobank of microorganisms: Unique possibilities for long-term authorized depositing of commercial microbial strains. In: *Microbes in applied research: current advances and challenges*. Ed. by A. Mendez-Vilas. Hackensack: World Scientific Publishing Co; 2012. P. 331-334. [https://doi.org/10.1142/9789814405041\\_0066](https://doi.org/10.1142/9789814405041_0066).
- Убугунова В.И. Экологические условия формирования почв речных пойм Монголии и их свойства: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Иркутск, 1999. [Ubugunova VI. Ekologicheskie usloviya formirovaniya pochv rechnykh poym Mongolii i ikh svoystva. [dissertation] Irkutsk; 1999. (In Russ.)]
- Белозерцева И.А., Сороковой А.А., Доржготов Д., и др. Почвы бассейна озера Байкал и их картографирование на территории России и Монголии // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. — 2014. — № 5—2. — С. 114—120. [Belozertseva IA, Sorokovoy AA, Dorzhgotov D, et al. Ground of pool of lake baikal and their mapping in territory of Russia and Mongolia. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2014;(5-2):114-120. (In Russ.)]
- Шишов Л.Л., Тонконогов В.Д., Лебедева И.И., Герасимова М.И. Классификация и диагностика почв России. — Смоленск: Ойкумена, 2004. [Shishov LL, Tonkonogov VD, Lebedeva II, Gerasimova MI. Klassifikatsiya i diagnostika pochv Rossii. Smolensk: Oykumena; 2004. (In Russ.)]
- Valverde A, Velazquez E, Fernandez-Santos F, et al. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005;55(Pt 5):1985-1989. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63551-0>.
- Zamlynska K, Komaniacka I, Zembracki K, et al. Studies on lipid A isolated from *Phyllobacterium trifolii*

- РЕТРО2(T) lipopolysaccharide. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2017;110(11):1413-1433. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0872-0>.
18. Baimiev AK, Baimiev AK, Gubaidullin II, et al. Bacteria closely related to *Phyllobacterium trifolii* according to their 16S rRNA gene are discovered in the nodules of *Hungarian sainfoin*. *Russ J Genet*. 2007;43(5):587-90. <https://doi.org/10.1134/S1022795407050146>.
  19. Safronova VI, Sazanova AL, Kuznetsova IG, et al. *Phyllobacterium zundukense* sp. nov., a novel species of rhizobia isolated from root nodules of the legume species *Oxytropis triphylla* (Pall.) Pers. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018;68(5):1644-1651. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002722>.
  20. Mantelin S, Saux MF, Zakhia F, et al. Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56(Pt 4):827-839. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63911-0>.
  21. Flores-Felix JD, Carro L, Velazquez E, et al. *Phyllobacterium endophyticum* sp. nov., isolated from nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013;63(Pt 3): 821-6. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.038497-0>.
  22. Sanchez M, Ramirez-Bahena MH, Peix A, et al. *Phyllobacterium loti* sp. nov. isolated from nodules of *Lotus corniculatus*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64(Pt 3): 781-6. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.052993-0>.
  23. Jiao YS, Yan H, Ji ZJ, et al. *Phyllobacterium sophorae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of *Sophora flavescens*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015;65(Pt 2):399-406. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.067017-0>.
  24. Zhao L, Deng Z, Yang W, et al. Diverse rhizobia associated with *Sophora alopecuroides* grown in different regions of Loess Plateau in China. *Syst Appl Microbiol*. 2010;33(8):468-477. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.08.004>.
  25. Zhang YJ, Zheng WT, Everall I, et al. *Rhizobium anhuiense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vicia faba* and *Pisum sativum*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015;65(9):2960-7. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.000365>.
  26. Li Y, Wang ET, Liu Y, et al. *Rhizobium anhuiense* as the predominant microsymbionts of *Lathyrus maritimus* along the Shandong Peninsula seashore line. *Syst Appl Microbiol*. 2016;39(6):384-390. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.07.001>.
  27. Gurusamy C, Bal A, McKenzie D. Nodulation of beach pea (*Lathyrus maritimus* [L.] Bigel.) induced by different strains of rhizobia. *Can J Plant Sci*. 1999;79(2):239-42. <https://doi.org/10.4141/P98-039>.
  28. Alves LM, de Souza JAM, Varani AM, Lemos EGM. The family *Rhizobiaceae*. In: The Prokaryotes. Ed. by E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, et al. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. P. 419-437. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1\\_297](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_297).
  29. De Meyer SE, Willems A. Multilocus sequence analysis of *Bosea* species and description of *Bosea lupini* sp. nov., *Bosea lathyri* sp. nov. and *Bosea robiniae* sp. nov., isolated from legumes. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012;62(Pt 10):2505-10. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.035477-0>.
  30. Сазанова А.Л., Кузнецова И.Г., Сафронова В.И., и др. Изучение генетического разнообразия микросимбионтов копеечника щетинистого *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum*, произрастающего в Прибайкалье // Сельскохозяйственная биология. — 2017. — Т. 52. — № 5. — С. 1004–1011. [Sazanova AL, Kuznetsova IG, Safronova VI, et al. Study of the genetic diversity of microsymbionts isolated from *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum*, growing in the Baikal lake region. *Selskokhoziaistvennaia Biol*. 2017;52(5):1004-1011. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.5.1004rus>.

✉ Информация об авторах

**Денис Сергеевич Карлов** — канд. биол. наук, младший научный сотрудник ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург. SPIN: 8355-8091. E-mail: makondo07@gmail.com.

**Анна Львовна Сазанова** — канд. биол. наук, старший научный сотрудник ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург. E-mail: anna\_sazanova@mail.ru.

**Ирина Геннадьевна Кузнецова** — инженер-исследователь ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург. E-mail: kuznetsova\_rina@mail.ru.

✉ Information about the authors

**Denis S. Karlov** — PhD, Junior Researcher, Russian Collection of Agricultural Microorganisms. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia. SPIN: 8355-8091. E-mail: makondo07@gmail.com.

**Anna L. Sazanova** — PhD, Senior Researcher, Russian Collection of Agricultural Microorganisms. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia. E-mail: anna\_sazanova@mail.ru.

**Irina G. Kuznetsova** — Engineer-Researcher, Russian Collection of Agricultural Microorganisms. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia. E-mail: kuznetsova\_rina@mail.ru.



## ✿ Информация об авторах

**Вера Игоревна Сафронова** — канд. биол. наук, заведующая ведомственной коллекцией полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург. E-mail: v.safronova@rambler.ru.

**Нина Юрьевна Тихомирова** — научный сотрудник ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург. E-mail: arriam2008@yandex.ru.

**Жанна Павловна Попова** — канд. биол. наук, старший научный сотрудник ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург. E-mail: elestd@yandex.ru.

**Юрий Сергеевич Оследкин** — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург. E-mail: arriam2008@yandex.ru.

**Алла Васильевна Верхозина** — канд. биол. наук, руководитель группы «Гербарий» отдела устойчивости наземных экосистем. ФГБНУ «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» СО РАН, Иркутск. E-mail: allaverh@list.ru.

**Андрей Алексеевич Белимов** — д-р биол. наук, заведующий лабораторией ризосферной микрофлоры. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург. E-mail: belimov@rambler.ru.

## ✿ Information about the authors

**Vera I. Safronova** — PhD, Head, Russian Collection of Agricultural Microorganisms. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia. E-mail: v.safronova@rambler.ru.

**Nina Y. Tikhomirova** — Researcher, Russian Collection of Agricultural Microorganisms. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia. E-mail: arriam2008@yandex.ru.

**Zhanna P. Popova** — PhD, Senior Researcher, Russian Collection of Agricultural Microorganisms. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia. E-mail: elestd@yandex.ru.

**Yuriy S. Osledkin** — PhD, Leading Researcher, Russian Collection of Agricultural Microorganisms. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia. E-mail: arriam2008@yandex.ru.

**Alla V. Verkhosina** — PhD, Head of The Herbarium Group, Department of Terrestrial Ecosystems Resistance. Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry (SIPPB), Irkutsk, Russia. E-mail: allaverh@list.ru.

**Andrey A. Belimov** — DrSci, Head of Laboratory of Rhizosphere Microflora. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia. E-mail: belimov@rambler.ru.